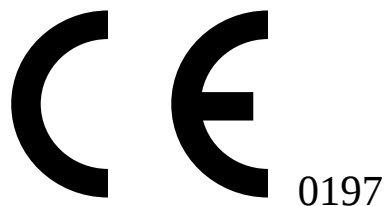


Referências

Código do Produto: 0205

1. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilising sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-367.
2. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Bach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA System, 1996. *Hum Immunol* 1997, 53: 98-128.
3. Nomenclature for factors of the HLA System. Compiled by Steven G. E. Marsh for the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. <http://www.anthonynolan.com/HIG/nomenc.html>
4. Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens*. 2001; 58: 299-307.



biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

tel + 351 231 410 946
fax + 351 231 410 947
e-mail info@genebox.com
www.genebox.com

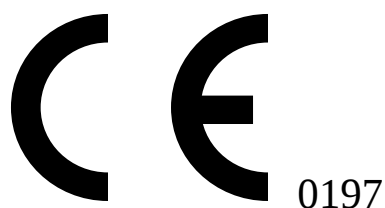
HLA-ABC Box 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções



Versão 1.8; Maio de 2010



biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

tel + 351 231 410 946
fax + 351 231 410 947
e-mail info@genebox.com
www.genebox.com

Folha de Dados de Segurança (3/3) Material Safety Data Sheet (MSDS)

12. Informação ecológica

Não existem dados disponíveis.

13. Informação sobre a eliminação de resíduos

Elimine o material de acordo com toda a regulamentação aplicável (os resíduos devem ser devidamente tratados e/ou incinerados).

14. Informação sobre o transporte

No transporte dos Kits devem estar asseguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 25°C. A duração do transporte não deve ser superior a 3 dias, de modo a garantir que todos os componentes do Kit cheguem em perfeitas condições aos seus destinatários.

15. Contactos Úteis

Número Nacional de Emergência: 112
Centro de Informação Anti-Venenos: 808 250 143

16. Outras informações

As informações a cima disponíveis são baseados no nível de conhecimento actual, devendo ser utilizado apenas como guia. A geneBOX - R&D Diagnostic Tests não se responsabiliza por qualquer dano causado pela manipulação inadequada ou pelo contacto com os referidos produtos.

**Para mais esclarecimentos, por favor contactem com o apoio
técnico para o
+351 231 410 946**

Folha de Dados de Segurança (2/3)

Material Safety Data Sheet (MSDS)

6. Protecção pessoal.

Protecção das mãos: use luvas apropriadas, resistentes a químicos.

Protecção dos olhos: recomenda-se o uso de óculos de protecção química.

7. Manipulação e armazenamento

Manipulação: evite o contacto directo com a substância.

Armazenamento: armazene à temperatura aconselhada, proteja do contacto com a luz.

Danificação da embalagem protectora: rejeitar o constituinte contido na embalagem.

8. Perigos

Os componentes da mistura de reacção podem ser perigosos se inalados, ingeridos ou absorvidos pela pele. Este material pode causar irritação da pele, dos olhos e do tracto respiratório. A ingestão de grandes quantidades desta mistura pode causar dores de estômago, vômitos ou diarreia.

9. Medidas de Primeiros Socorros

No caso de **contacto com os olhos**, deve lavar imediatamente os olhos com água abundante por cerca de 15 minutos. Deve consultar o seu médico.

No caso de **contacto com a pele**, deve lavar imediatamente a zona afectada com água corrente e sabão. Lave a roupa contaminada antes da sua utilização.

No caso de **ingestão**, lave a boca com água abundante. Deve contactar o seu médico se necessário.

No caso de **inalação**, mudar a vítima para um local arejado. Se se encontrar inanimado aplique respiração artificial. Se apresentar dificuldades respiratórias aplique oxigénio. Deve consultar o seu médico.

10. Medidas a tomar em caso de incêndio

Meios de extinção: Água, dióxido de carbono, pó químico seco ou espuma apropriada.

Meios de extinção não aconselhados: não existem restrições conhecidas.

Perigos específicos de exposição: em caso de incêndio podem emitir fumos tóxicos de dióxido e monóxido de carbono, nitrogénio, fósforo, cloreto de hidrogénio, e gás hidrogénio.

Equipamento especial de combate ao incêndio: quando são libertadas grandes quantidades de substância trabalhe apenas com protecção adequada para olhos e pele.

11. Medidas a tomar no caso de derrame accidental

Precauções pessoais: evite o contacto directo com a substância.

Limpeza: limpe normalmente a área afectada, não são necessários cuidados adicionais.

Protecção da pele: use uma bata de laboratório.

Índice

Apresentação.....	4
Alterações e Melhoramento do produto.....	4
Controlo da Qualidade	5
Validação – Linhas Celulares.....	6
Componentes do HLA-ABC Box 1.0 Typing Kit.....	7
Protocolo de amplificação por PCR.....	8
Reagentes.....	8
Extracção de DNA.....	8
Amplificação por PCR	8
Parâmetros do programa de PCR.....	9
Protocolo de electroforese em gel de agarose.....	10
Preparação do gel a 2%.....	10
Electroforese.....	10
Esquema da placa HLA-ABC Box 1.0	11
Identificação da placa HLA-ABC Box 1.0	12
Folha de interpretação dos Resultados.....	13
Tabela de interpretação dos Resultados	17
Guia de resolução de problemas	19
Avisos e precauções.....	20
Guia técnico.....	21
Garantia.....	22
Aviso de Garantia.....	23
Declaração de Conformidade	24
Folha de dados de segurança.....	25
Referências.....	28

Apresentação

Este kit contém placas com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética de baixa resolução dos genes de HLA-A, HLA-B e HLA-C.

Alterações e melhoramento do Produto

O kit HLA-ABC Box está constantemente a ser actualizado, ao nível da sua especificidade e interpretação, de modo a incluir novos alelos que venham a ser descritos. Este produto pode também ser melhorado de modo a aumentar o seu rendimento.

As alterações, adições ou modificações de primers, em relação ao lote anterior estão detalhadas na tabela abaixo:

Tubo	primers	motivo
N/A		

Folha de Dados de Segurança (1/3)

Material Safety Data Sheet (MSDS)

geneBOX - R&D Diagnostic Tests™ PCR-SSP Kits

Produtos de tipagem SSP da geneBOX™

Esta folha de dados de segurança é aplicável a todos os produtos de tipagem por PCR-SSP da geneBOX™.

1. Produtos Químicos e Identificação da Companhia

Data de realização:	Maio de 2010
Grupo do produto:	Produtos de tipagem SSP da geneBOX™
Manufaturação:	geneBOX - R&D Diagnostic Tests, biocant – centro de inovação em biotecnologia núcleo 4, lote 3 3060-197 cantanhede, portugal
tel/fax:	+351 231 410 946/ +351 231 410 947
e-mail:	info@genebox.com

2. Composição e Informação sobre os reagentes

Componente	Químico	Nome vulgar
Placa	Acido Desoxiribonucleico Vermelho de Cresol	Oligonucleótido
Mistura de reacção	Desoxiribonucleótidos Tampão NH ₄ Cloreto de Magnésio Vermelho de Cresol Glicerol Taq DNA Polimerase	Nucleótidos MgCl ₂ Taq

3. Propriedades físico-químicas:

Componente	Aspecto	Cor	Odor
Placa	seco, no fundo do poço	vermelho	nenhum
Mistura de reacção	líquido	vermelho/rosa	nenhum

4. Informação Toxicológica

Químico	Toxicidade
Glicerol	LD50= oral 4090 mg/kg (ratinho) LD50= oral 12600 mg/kg (rato) LD50= oral 1480 mg/kg (humano)

5. Estabilidade e reactividade

Condições a evitar: Calor e humidade.

Incompatibilidades: Bases e agentes oxidantes fortes.

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: HLA-ABC

Numero do Produto: GB.02.05

Utilização: Tipagem de baixa resolução das moléculas de HLA-A, B e C.

Produção: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede, portugal

Nós, geneBOX - investigação e desenvolvimento de testes de diagnóstico, indubitavelmente declaramos que este produto, ao qual se relaciona esta declaração de conformidade, está em conformidade com os seguintes documentos normativos, ISO 9001:2008 e ISO 13485:2004. Seguindo ainda, as indicações da Directiva Europeia 98/79/CE sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*, Anexo II lista B, conformidade de acordo com o Anexo IV, transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia.

A ficha e os documentos técnicos deste produto são mantidos na geneBOX, biocant, centro de inovação em biotecnologia, 3060-197 Cantanhede, Portugal.

Organismo Notificador: TÜV Rheinland Product Safety GmbH, TÜV Rheinland Group, Am Grauen Stein 51105 Köln/Cologne - Germany (Organismo notificador número: 0197)



Sandra Balseiro
Directora Técnica

Controlo de Qualidade

Foram usadas amostras de DNA de 52 linhas celulares constantes do *IHWG Sequence Polymorphism Reference DNA SSOP Panel* para verificar a especificidade das misturas de primers.

Não foram registados Falsos positivos ou falsos negativos.

O controlo negativo pode detectar contaminação cruzada com produtos de PCR.

Validação - Linhas Celulares

Kit de Tipagem SSP HLA-ABC baixa resolução							
Linha celular		Tipagem celular			HLA-A Nº dos poços positivos	HLA-B Nº dos poços positivos	HLA-Cw Nº dos poços positivos
		HLA-A*	HLA-B*	HLA-Cw*			
9215	M7	0202;0301	3501;5301	0401	3/4/25/36	55/56/57/69/70	76
9273	LADA	0201;8001	0702;5703	0701;0802	3/24/25/26	33/41/46/69/70	80/84
9263	G085	0101;2901	4006;5201	12022;1502	1/17/23/26	29/30/32/59/69/70	85/86/89
9373	FH1	0205;6802	1402;5801	0701;0802	3/13/15/25	39/47/69/70	80/84
9030	JHAF	31012	51011	1502	19/23/26	29/30/31/69	89
9035	JBush	3201	3801	1203	20/22/26	43/69	87
9045	TUBO	0206;0301	51011	0704;1502	3/4/25/26	29/30/31/69	83/89
9220	XLI-ND	0210;3001	1302;4006	0602;0801	3/18/25/26	38/59/69/70	78/84
9077	T7527	0207	4601	0102	3/25	41/64/70	71
9085	EJ328	3002	1801	0501	18/26	49/70	77
9103	KT14	2402;2602	4006;51011	0801;1402	6/8/9/25/26	29/30/31/59/69/70	84/88
9374	FH2	3401;0201	4001;4402	0501;0304	3/10/25/26/28	35/36/59/60/61/69/70	77/74
9375	FH3	3301;3101	1402;3502	0401;0802	19/21/23/26	39/55/56/57/70	76/84
9364	GRC202	0211;68012	3505;4004	03041;04011	3/13/14/25	55/57/59/70	74/76
9371	ISH4	0218;1101	1501;4601	04011;0102	3/12/25/26	40/41/64/70	71/76
9368	280599	2604;2402	3901;3802	0702/3	6/8/9/25/26	43/44/69/70	81
9367	LCK	0203;1102	38021;4601	0702;1202	3/12/25/26	41/43/64/69/70	81/85/86
9394	BPOT	0201	0703;15	03031	3/25	33/40/41/70	73
9048	LBUF	3001	1302	0602	18/26	38/69	78
9032	BSM	0201	1501	0304	3/25	40/41/70	74
9237	APA	1101;2403	1502;5502	0801;1203	6/12/25/26	41/52/70	84/87
9253	THAI742	2403;3303	1512;4601	0102;03031	6/21/23/25/26	40/41/64/70	71/73
9369	ISH3	2402	1526N	04011	6/25	40/41/70	76
9380	FH6	2402;2901	2702;0705/6	02022;1505	6/17/23/25/26	33/54/69/70	79/92
9376	FH4	0101	2703;2705	02022	1/26	54/69	72
9266	PAR	11011;2402	2706;4801	03041;0801	6/12/26/25	54/61/69/70	74/84
9377	FH5	2902;0201	2709;4403	0102;1601	3/17/23/25/26	35/36/54/69	71/93
9068	BM9	0201	3501	0401	3/25	55/56/57/70	76
9056	K05E	0201	3503	1203	3/25	55/56/57/70	87
9009	KAS011	0101	3701	0602	1/26	58/69	78
9381	FH7	0206;3002	3908;1801	0702;0501	3/18/25/26	44/49/70	77/81
9385	FH11	0301;2902	4404;07021	0702;1601	4/17/23/26	33/35/36/69	81/93
9047	PLH	0301	4701	0602	4/26	65/69	78
9392	GN00218	0301;2902	4703	0602;0701	4/17/23/26	65/69	78/80
9040	BM15	0101	4901	0701	1/26	51/69	80
9092	BM92	2501	51011	0102	7/9/26/27	29/30/31/69	71
9370	230699	0206;2402	5103;07021	0702;1402	3/6/25	29/30/31/33/69/70	81/88
9372	ISH5	2402	5401;4801	0803;0102	6/25	52/61/66/70	71/84
9052	DBB	0201	5701	0602	3/25	46/69	78
9267	LE023	6601;3201	7301;51011	0102;15051	9/10/20/22/26/27	29/30/31/67/70	71/92
9382	FH8	11011;3402	8201;27052	0302;0102	12/14/26/28	52/54/69/70	71/74/75
9366	Daudi	0102;6601	5801;5802	0302;0602	1/9/10/26/27	47/69	74/75/78
9014	MGAR	2601	0801	0701	8/26/27	34/70	80
9053	HOR	3303	44031	1403	21/23/26	35/36/69	88
9021	RSR	3001;6802	4201	1701	13/15/18/25/26	63/70	95
9024	KT17	0201;1101	15011;3501	0303;0401	3/12/25/26	40/41/55/56/57/70	73/76
9016	RML	0204	51011	1502	3/25	29/30/31/69	89
9297	HAG	02011	4102	1701	3/25	61/70	95
9386	FH12	0225;1101	4402;27052	0501;02022	3/12/25/26	35/36/54/69	72/77
9387	FH13	3402;6802	44031;1501	0401;03042	9/10/13/15/25/26/28	35/36/40/41/69/70	76/74
9398	FH18	7401;3601	5301;5703	0401;0701	2/22/23/26	48/46/56/69	76/80

Aviso de garantia

geneBOX –investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos responsabiliza-se, perante os seus clientes, pelos defeitos no material e componentes dos seus produtos aplicados em condições normais. Os produtos da empresa que apresentam esta garantia devem ser substituídos, sem encargos para o cliente.

Esta garantia aplica-se só para produtos que sejam manipulados e armazenados de acordo com as especificações e recomendações de utilização.

As reclamações devem ser enviadas, por escrito, directamente para a geneBOX e devem ser acompanhadas por uma cópia da guia de transporte ou factura do produto.

Este produto não pode ser reformulado, reembalado ou revendido em nenhuma forma sem o exposto consentimento da geneBOX - investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos.

Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos garante que os primers presentes no kit de tipagem HLA-ABC Box apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

1. Tira de Tipagem

Armazenamento a -20°C, os primers desidratados permanecem estáveis durante 12 a 19 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).

Armazenamento a 4°C, os primers desidratados permanecem estáveis durante 12 meses a partir da data de produção.

À temperatura ambiente, os primers desidratados permanecem estáveis durante 3 a 4 semanas a partir da data de recepção.

Quando o selante é removido os primers desidratados permanecem estáveis durante 2 dias, no máximo, desde que não humedecem. estáveis durante 2 dias, no máximo, desde que não humedecem.

2. Mistura de Reacção

Armazenamento a -20°C, a mistura de reacção permanece estável durante 18 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).

Armazenamento a 4°C, a mistura de reacção permanece estável durante 15 dias a partir da data de recepção.

À temperatura ambiente, a mistura de reacção permanece estável durante 3 dias a partir da data de recepção.

A mistura de reacção nunca deve ser deixada ou armazenada com a tampa aberta.

3. DNA

O DNA extraído por *salting out* ou por qualquer outro método deve ser armazenado a 4°C ou -20°C. Ao optar pela congelação das amostras, devem ser evitados ciclos repetidos de congelação/dcongelação, de modo a impedir a degradação da amostra.

As amostras de DNA armazenadas em dH₂O permanecem estáveis durante, pelo menos, 4 semanas (a 4°C) ou 2 anos (a -20°C).

As amostras de DNA armazenadas em tampão TE permanecem estáveis durante, pelo menos, 2 anos (a 4°C) ou 5 anos (a -20°C).

Componentes do HLA-ABC Box Typing Kit

- **Placas de tipagem de baixa resolução de HLA-A, B e C⁺**
(12 tipagens)

12 placas (1 amostra cada) (conservar de -15 a -30 °C)

- **Mistura de reacção (com Taq Polimerase)**

12 X 310 µl (conservar de -15 a -30°C)

- **Selantes de Placas**

12 selantes para PCR transparentes

- **Manual de instruções**

1 Manual de Instruções

⁺ com pares de primers específicos desidratados.

Componentes da PCR Master Mix

Nucleótidos:

concentração final de cada dNTP é 600 µM

Tampão da PCR:

concentrações finais são 3,3x NH₄, 2,0 mM MgCl₂ e 0,4 u/µl Amplitaq DNA polimerase, pH 8.3.

Glicerol:

concentração final é 16,6%

Vermelho de cresol:

concentração final é de 300µg/ml

Protocolo de amplificação por PCR

Reagentes

- Amostra de DNA (100-200 ng/μl)
- PCR Master Mix
- Água bi-destilada estéril (não fornecida)

Extracção de DNA

Para a tipagem por SSP é necessário DNA extra puro. Recomenda-se que o isolamento de DNA seja efectuado utilizando kits de extracção com marcação CE, que garantam um rácio DO 260/280 maior do que 1.6 e uma concentração entre 100ng – 200 ng/μl.

Alternativamente, o DNA pode ser extraído utilizando sais de Brometo de Trimetilamonio (DTAB/CTAB) ou por *salting out*, dissolvendo-o em Tampão TE. Devem ser asseguradas o mesmo nível de DO e de concentração.

NÃO UTILIZE SANGUE HEPARINIZADO COM ESTE MÉTODO

Amplificação por PCR

1. Agite brevemente os tubos de DNA e da mistura de reacção.
2. Junte:
 - **305 μl da PCR Master Mix,**
 - **615 μl de dd H₂O**num tubo de 0,7 ml ou 1,5 ml.
3. Agite vigorosamente durante 15s.
4. Pipete **10 μl** da mistura para poço do controlo negativo.
5. Adicione á mistura de reacção, **80 μl da amostra de DNA** (conc. 100-200 ng/μl)
6. Agite vigorosamente durante 15s
7. Pipete **10 μl** da mistura para cada um dos restantes 95 poços.

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HLA-ABC Box 1.0 Typing Kit™ a pureza da amostra de DNA é crítica. Ter uma amostra pura significa obter uma razão 260nm/280nm de DO superior a 1.6 e uma porção de DNA superior a 9.4 kb. A elevada degradação do DNA ou uma razão 260nm/280nm inferior a 1.5 requer uma nova extracção de DNA.

Cada amostra de DNA deve ter aproximadamente 100 a 200 ng/μl. Concentrações elevadas de DNA provocam um declínio considerável na especificidade da PCR.

Recomenda-se o uso de qualquer kit de extracção de DNA que apresente marcação CE, de modo a obter um DNA extra puro.

2. Taq Polimerase

O HLA-ABC Box 1.0 Typing Kit™ foi intensivamente testado utilizando a Taq da Reagente 5 (Reagente 5, Lisboa, Portugal).

3. Mistura de reacção

Para uma boa performance da tipagem com o HLA-ABC Box 1.0 Typing Kit™ é obrigatória a utilização da PCR Master Mix fornecida com o Kit.

4. Procedimentos de amplificação

No fim da PCR, examine o grau de evaporação e de condensação da mistura de reacção da PCR. Se as perdas de volume forem superiores a 20% não devem ser validados os resultados obtidos. De forma a prevenir esta situação devem adicionar previamente óleo mineral à mistura de reacção ou utilizar um adaptador de silicone para placas de 96. Também se deve ter em atenção a temperatura de aquecimento do aparelho. Se a temperatura de aquecimento não for suficiente vão se verificar problemas de condensação.

5. Termociclador

Recomenda-se utilização de qualquer Termociclador que apresente as seguintes características:

- "heating rate" superior a 2.5°C/sec; "cooling rate" superior a 1.5°C/sec; gama de temperaturas 4-100°C; uniformidade de temperaturas ±0.5°C; "heated lid" superior a 100°C.

6. Validade

Como especificado na embalagem.

**Se os problemas persistirem, por favor contactem com o
apoio técnico para o
+351 231 410 946**

Avisos e precauções

A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença de amplificações inespecíficas. Em baixo encontram-se descritas as recomendações da Genebox:

- Separe fisicamente as áreas de pré-PCR e de pós-PCR.
- O fluxo Laboratorial deve ser sempre unidireccional da área pré-PCR para a área pós-PCR.
- Deve sempre utilizar-se equipamentos específicos para cada area de trabalho (preparação de amostras; pré-amplificação amplificação e pós-amplificação).
- Todos os equipamentos utilizados na área de pós-PCR não devem sair desta zona.
- Utilize micropipetas, luvas e batas específicas para cada área.
- Utilize preferencialmente luvas sem talco (uma vez que o talco pode inibir a reacção de PCR).
- Utilize pontas de filtro de forma a minimizar contaminações cruzadas.
- Verifique periodicamente as micropipetas de forma a assegurar a variação de pipetagem inferior a 5%.
- Utilize micropipetas adaptadas a cada volume de pipetagem.
- Verifique periodicamente os termocicladores, de forma a assegurar a variação de temperaturas inferiores a 1%.
- Abra e feche os reagentes com cuidado. Depois de utilizar armazene os restantes componentes do kit às temperaturas recomendadas devidamente fechados.
- Não utilize o kit com a validade expirada.
- Os componentes dos kits são resistentes às temperaturas de armazenamento indicadas. O armazenamento dos kits a temperaturas não recomendadas podem levar à rupturas no material e contaminação dos reagentes dos kits.
- Os materiais plásticos fornecidos neste kit são resistentes à gama de temperaturas de utilização e armazenamento recomendadas. A sua utilização em gamas distintas de temperaturas pode causar rupturas impossibilitando a utilização normal do kit.
- Verifique a concentração e qualidade de todas as amostras de DNA antes de utilizar este kit.

Instruções de gerais de segurança no laboratório:

- Não coma, beba ou fume dentro do laboratório.
- Utilize sempre luvas descartáveis e mude-as com frequência.
- Utilize batas limpas e proteja os olhos (sempre que se justifique).
- Lave as mãos antes e depois de qualquer manipulação de amostras ou reagentes.
- Lave a área de trabalho antes e depois de qualquer manipulação.
- Não pipete com a boca.

8. Sele a placa de tipagem com um autocolante e ponha-a num termociclador de 96 poços.

Parâmetros do programa PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Denaturação	96 °C	1 min	1
Denaturação Emparelhamento Extensão	96 °C 70 °C 72 °C	25 seg 45 seg 30 seg	5
Denaturação Emparelhamento Extensão	96 °C 65 °C 72 °C	25 seg 45 seg 30 seg	21
Denaturação Emparelhamento Extensão	96 °C 55 °C 72 °C	25 seg 1 min 2 min	4
Extensão	72 °C	10 min	1
Guardar (opcional)	4 °C	25 seg	1

9. No final da PCR guarde a placa a 2-8 °C.
10. Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 2%.

Protocolo de electroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 2%

1. Dissolver **4 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
2. Dissolver completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
3. Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50°C.
4. Adicione pelo menos **20 µl de brometo de etídio⁺⁺** (10 mg/ml) **ou de Sybr Safe** (10000x concentrado à agarose). Agite até estar completamente incorporado.
5. Numa superfície nivelada, monte a placa do gel com 96 poços.
6. Verta uma camada de gel com cerca de **5mm**.
7. Deixe o gel arrefecer.

⁺⁺ Atenção este reagente é um forte agente mutagénico (leia atentamente a MSDS do produto).

Electroforese

1. Submirja o gel na tina de electroforese com tampão TAE 1X.
2. Remova os pentes com cuidado do gel.
3. Adicione **10 µl** do **produto de PCR** em cada poço.
4. Ligue a tina de electroforese à corrente com uma voltagem média (**115V**).
5. Deixe a electroforese correr por cerca de 20 minutes, ou até o corante estar a 2/3 da linha.
6. Ponha o gel no transiluminador.
7. Fotografe o gel e identifique-o.
8. Use a **Tabela de interpretação de resultados (1-4)** para interpretar os resultados.

Guia de resolução de problemas

PROBLEMAS	POSSIVEIS CAUSAS	SUGESTÕES
Bandas controlo e específicas fracas	Concentração da amostra de DNA baixa	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Reextraia a amostra de DNA ou tente não adicionar água à mistura de reacção
	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
		Repurifique a amostra de DNA
Os controlos internos falharam em diversos poços	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
		Repurifique a amostra de DNA
	Produtos de amplificação secos	Verifique a selagem das placas
		Repita a tipagem utilizando um adaptador de silicone para placas de 96 e/ou adicione óleo mineral.
Falsos negativos de uma banda específica com o controlo interno normal	Degradação da amostra de DNA	Reextraia a amostra de DNA de material fresco
		Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
Deteção de mais de dois alelos específicos	Amostra de DNA muito concentrada	Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Dissolva o DNA em dH_2O de forma a obter a concentração exacta
		Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	Contaminação com outros produtos de PCR ou outras amostras de DNA durante a preparação do PCR	Limpe a zona de trabalho
		Trabalhe em zonas Pré e Pós-PCR separadas
		Utilize batas distintas para a zona Pré e Pós-PCR
Esfregaço de bandas	Degradação da amostra de DNA	Mude de luvas frequentemente
		Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	Amostra de DNA muito concentrada	Reextraia a amostra de DNA de material fresco
		Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
		Verifique a qualidade e concentração do DNA
		Dissolva o DNA em dH_2O de forma a obter a concentração exacta
	Problemas com tampão de electroforese: Fora de prazo ou composição errada	Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
		Use um tampão recomendado novo

Tabela de interpretação de resultados (2/2)

Nº do tubo	5 7	5 8	5 9	6 0	6 1	6 2	6 3	6 4	6 5	6 6	6 7	6 8	6 9	7 0
Banda específica	1 2 8	6 0 6	5 4 4	7 8 4	6 0 8	7 8 1	7 2 2	4 5 9	4 1 4	5 0 8	2 8 9	4 0 0	1 8 0	1 8 0
B*07														
B*08							?							
B*13														
B*14														
B*15	*											*		
B*18	+													
B*27														
B*35	+													
B*37		+												
B*38														
B*39														
B*40			+	*	*									
B*41						+								
B*42							+							
B*44		+												
B*45														
B*46								+						
B*47			+						+					
B*48					+									
B*49														
B*50														
B*51		+												
B*52														
B*53														
B*54									+					
B*55														
B*56														
B*57														
B*58														
B*59														
B*67														
B*73										+				
B*78	+										+			
B*81														

Nº do tubo	7 1	7 2	7 3	7 4	7 5	7 6	7 7	7 8	7 9	8 0	8 1	8 2	8 3	8 4	8 5	8 6	8 7	8 8	8 9	9 0	9 1	9 2	9 3	9 4	9 5
Banda específica	1 0 2 6	5 2 3 1	5 3 0	5 2 9	2 0 6	3 3 0	5 6 3	3 0 4	5 0 0	5 1 6	3 0 2	4 9 4	5 6 3	1 6 2	4 4 9	5 3 7	4 5 3	5 4 1	4 0 7	4 0 6	4 2 3	4 2 4	5 1 2	5 1 2	4 7 5
Cw*01	+																								
Cw*02		+																							
Cw*03			*	*	*																				
Cw*04						+																			
Cw*05							+																		
Cw*06								+																	
Cw*07									+	*	*	*	*							*					
Cw*08						+							+												
Cw*12														+	*	*	*								
Cw*13															+										
Cw*14																	+			*	*	*	*		
Cw*15																				*	*	*	*	*	
Cw*16																							*	*	
Cw*17		+																							+
Cw*18								+																	
A*2604											+														

* Positivo para alguns subtipos

Identificação da placa HLA-ABC Box 1.0

	H	G	F	E	D	C	B	A	
									1
									2
									3
									4
									5
									6
									7
									8
									9
									10
									11
N C									12

Identificação da placa HLA-ABC Box 1.0

Posição	HLA	Posição	HLA
1a	A	7a	B
1b	A	7b	B
1c	A	7c	B
1d	A	7d	B
1e	A	7e	B
1f	A	7f	B
1g	A	7g	B
1h	A	7h	B
2a	A	8a	B
2b	A	8b	B
2c	A	8c	B
2d	A	8d	B
2e	A	8e	B
2f	A	8f	B
2g	A	8g	B
2h	A	8h	B
3a	A	9a	B
3b	A	9b	B
3c	A	9c	B
3d	A	9d	B
3e	A	9e	B
3f	A	9f	B
3g	A	9g	C
3h	A	9h	C
4a	A	10a	C
4b	A	10b	C
4c	A	10c	C
4d	A	10d	C
4e	B	10e	C
4f	B	10f	C
4g	B	10g	C
4h	B	10h	C
5a	B	11a	C
5b	B	11b	C
5c	B	11c	C
5d	B	11d	C
5e	B	11e	C
5f	B	11f	C
5g	B	11g	C
5h	B	11h	C
6a	B	12a	C
6b	B	12b	C
6c	B	12c	C
6d	B	12d	C
6e	B	12e	C
6f	B	12f	C
6g	B	12g	C
6h	B	12h	CN

Tabela de interpretação de resultados (1/2)

Nº do tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Banda espec.	5	5	8	6	5	5	3	4	4	4	4	5	4	4	6	4	5	5	4	4	4	4	4	5	4	4	1	1
	7	6	1	2	5	5	9	0	3	1	4	1	4	2	2	0	1	6	8	2	6	9	1	4	4	6	6	0
A*01	+																									+		
A*02				+																						+		
A*03					+																						+	
A*11												+															+	
A*23						+																				+		
A*24							+																				+	
A*25								+		+																	+	+
A*26									+	+																	+	+
A*29																		+					+				+	+
A*30																			+								+	+
A*31																				+							+	+
A*32																					+						+	+
A*33																						+					+	+
A*34										+	+				+												+	+
A*36		+																									+	+
A*43									+		+																+	+
A*66										+	+																+	+
A*68													+	+	+												+	+
A*69															+		+										+	+
A*74																						+	+				+	+
A*80																								+		+	+	+

Nº do tubo	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5
Banda espec.	5	4	4	4	6	6	5	5	6	4	3	3	4	6	5	5	5	5	3	3	3	5	3	6	4	2	1	3
	0	0	5	4	1	0	3	7	0	7	0	1	0	2	3	2	0	0	7	8	0	5	9	3	5	5	0	9
B*07					+																							
B*08						+																						
B*13											+																	
B*14												+																
B*15			*					+				*	*	*						+								+
B*18																					+							
B*27																							+			+		*
B*35																											*	*
B*37																												
B*38																+												
B*39																	+											
B*40						+							+										+					
B*41																												
B*42																												
B*44							+	+														?						+
B*45								+	+																			
B*46													+															
B*47																												
B*48													+															
B*49									+														+	+				
B*50									+															+				
B*51	+	+	+																			+						+
B*52	+	+		+																		+						+
B*53																											+	+
B*54																									+			
B*55																									+			
B*56																									+			
B*57														+											+	+		
B*58																												
B*59																												
B*67																								+	+			
B*73																												
B*78	+		+																									
B*81					+																							

Folha de interpretação de resultados (4/4)

Mix	HLA	alelo	Serotipo	ampl	Contr**
71	Cw	Cw*0102	Cw*01	1026	1600+796
72	Cw	Cw*0202,*1701/2	Cw*02; 17	521	1600+796
73	Cw	Cw*0303	Cw*03	530	1600+796
74	Cw	Cw*0302/4	Cw*03	529	1600+796
75	Cw	Cw*0302	Cw*03	206	1600+796
76	Cw	Cw*0401-3, *1801	Cw*04; 18	330	1600+796
77	Cw	Cw*0501	Cw*05	563	1600+796
78	Cw	Cw*0602	Cw*06	304	1600+796
79	Cw	Cw*1801	Cw*18	500	1600+796
80	Cw	Cw*0701	Cw*07	516	1600+796
81	Cw	Cw*0702/3	Cw*07	302	1600+796
82	Cw	Cw*0703, A*2604	Cw*07 A*26	494	1600+796
83	Cw	Cw*0704	Cw*07	563	1600+796
84	Cw	single 162bp=Cw*0802,162&632bp=Cw*0801/3	Cw*08		1600+796
85	Cw	Cw*1202,*1301	Cw*12; 13	449	1600+796
86	Cw	Cw*1202	Cw*12	537	1600+796
87	Cw	Cw*1203	Cw*12	453	1600+796
88	Cw	Cw*1402/3	Cw*14	541	1600+796
89	Cw	Cw*1502	Cw*15	407	1600+796
90	Cw	Cw*1503	Cw*15	406	1600+796
91	Cw	Cw*1504,*0701	Cw*15; 07	423	1600+796
92	Cw	Cw*1505	Cw*15	512	1600+796
93	Cw	Cw*1601	Cw*16	424	1600+796
94	Cw	Cw*1602	Cw*16	475	1600+796
95	Cw	Cw*1701/2	Cw*17	512	1600+796
96	Cw	Controlo Negativo ABC			

****Os pares de primers controlo emparelham com sequências não polimórficas. Os primers de controlo positivo interno amplificam segmentos do gene HLA-DRB1 e PIC1. Originando fragmentos com 1600 + 796 pares de bases e 256 pares de bases, respectivamente. Na presença da banda específica a banda controlo pode ver diminuída a sua intensidade. A reacção de PCR só é válida na presença da banda controlo ou, nalguns casos, na presença da banda específica. Na ausência da banda controlo, por favor, repita a tipagem.**

NOTA: Se o PCR tiver bandas com tamanhos diferentes dos previstos não as considere pois pode tratar-se de bandas não específicas ou artefactos.

Folha de interpretação de resultados (1/4)

Mix	HLA	alelo	Serotipo	ampl	Contr**
1	A	A*0101-19	A*01	574	256
2	A	A*3601/02	A*36	563	256
3	A	A*02	A*02	813	256
4	A	A*0301-04/08, 2418, 3204, 3602, 6819	A*03; 24; 32; 36; 68	626	256
5	A	A*2301-06, 0246, 2413, 2416, 2418	A*23; 02; 24;	555	256
6	A	A*2402-30 excepto *2406/8/13/16/18/22/24/25	A*24	555	256
7	A	A*2501-03	A*25	398	256
8	A	A*2601/02/04/07-15,*4301	A*26; 43	400	256
9	A	A*2501-03,*2601-15 excepto 2607,*3401-03,*6601-3	A*25; 26	438	256
10	A	A*3401-03,*6601/2,*2502,*2613	A*34; 66; 25; 26	417	256
11	A	A*4301	A*43	440	256
12	A	A*1101/02/04-07/09	A*11	518	256
13	A	A*6801/2,*6901/06-14/16-19,*0234/35,*2407/24,	A*68; 69; 02; 24	445	256
14	A	A*6801/03/04/05/08/09/11/12/16/19	A*68	426	256
15	A	A*6802/15/18N	A*68	623	256
16	A	A*6901,*0234/35	A*69; 02	405	256
17	A	A*2901-04	A*29	515	256
18	A	A*3001-09	A*30	560	256
19	A	A*3101/02/05	A*31	481	256
20	A	A*3201/02/05/06	A*32	421	256
21	A	A*3301/03-06	A*33	461	256
22	A	A*3201-03/05/06,*7401-04, B*4405	A*32; 74; B*44	494	256
23	A	A*2901-04,*3101/02/05,*3301/03-06,*7401/02/04	A*29; 31; 33; 74	414	256
24	A	A*8001	A*80	543	256
25	A	A*0201-46 excepto *0223/24,*2301/02/04-06,*2402-30 excepto *2416/19/21,*6801-19,*6901	A*02; 24; 68; 69	446	256
26	A	Todos excepto A*0201-46 excepto 23/24,*2301/02/04-06,*2402-30 excepto 16/19/21,*6801-19,*6901	A*01; 03; 11; 23; 25; 26; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 36; 43; 66; 74; 80	446	256
27	A	A*2501, *2601/3/5/7/8,*6601/2/3,*4301 *6602/03	A*25; 26; 66; 43; 66	170	256
28	A	A*3401-03,*2609,*3103/04	A* 34; 26; 31	170	256

Folha de interpretação de resultados (2/4)

Mix	HLA	Alelo	Serotipo	ampl	contr --
29	B	B*5101-23 except *5115,*5201/03,*7801-04	B*51; 52; 78	504	256
30	B	B*5101-23 except *5110/131/15,*5201-03	B*51; 52	401	256
31	B	B*5101-23 except *5110/131/15,*7801/2,*1509	B*51; 78; 15	451	256
32	B	B*5201-03,*15012,*4026,*4028,*5107	B*52; 15; 40; 51	440	256
33	B	B*0702-24 except *0713/19/21,*4025,*8101,*3907,*4806,*6812	B*07; 40; 81; 39; 48; 68	619	256
34	B	B*0801-03/06-12,*3510	B*08; 35	606	256
35	B	B*4402-22 except *4406/06/15/16	B*44	537	256
36	B	B*4402-22 except 4406/16,*4501-03,*1514,*5002	B*44; 45; 15; 50	575	256
37	B	B*4501/03,*4901-03,*5001/02/04,*5402	B*45; 49; 50; 54	600	256
38	B	B*1301/02/06	B*13	471	256
39	B	B*1401-04	B*14	390	256
40	B	B*1501-07/12-15/19/20/24-28/31-36/38-40/43/46/49/50/53/54/55/57/60-62/64,*4003,*4802,*1304,*1801-12,*3520/28,*4003/20,*4417	B*15; 48; 13; 18; 35; 40; 44	422	256
41	B	B*1501/02/04-08/11-17/19-21/24-28/30/32-36/38/39/43/45/48/55-58/60/63,*4601/02,*5701-4,*1303/04,*4405/08	B*15; 46; 57; 13; 44	623	256
42	B	B*1509/10/18/21/23/27/51,*3526,*5122,*7803	B*15; 35; 51; 78	562	256
43	B	B*3801-06,*5119,*3920	B*38; 51; 39	500	256
44	B	B*1548,*3535,*39011-19/22-24,*6701	B*15; 35; 39; 67	507	256
45	B	B*67011/67012,*3910-17/20	B*67; 39	548	256
46	B	B*5701-07 except *5705	B*57	380	256
47	B	B*5801/04/05,*5705	B*58; 57	345	256
48	B	B*5801/04/05,*5104,*5301/02/04/06,*1513,*5705,*0712/14/18,*8301(*4406weak?)	B*58; 51; 53; 15; 57; 07; 83	319	256
49	B	B*1801-12	B*18	503	256
50	B	B*4901/03,*5901,*5115,*4418	B*49; 59; 51; 44	385	256
51	B	B*4901/02,*5001/02/04,*4005/15/16/23/26/28/32,*2704,*2706,*2710/15/18/20-22	B*49; 50; 40; 27	635	256
52	B	B*5401/02,*5501-03/05/07/09/10,*5601/02/04/07,*5901,*8201/02,*3917 Cw*15,	B*54; 55; 56; 59; 82; 39 Cw*15	490	256
53	B	B*5601-07,*8201/02,*8301,*0720/24	B*56; 82; 83; 07	551	256
54	B	B*2701-22 except *2712/16/18	B*27	150	256
55	B	B*3501-37 except *3512/20/22/26/28/31,*5301-06	B*35; 53	390	256
56	B	B*3501-04/06-09/11/12/14/15/17-21/23-27/29/30/33-36,*0712/14/18,*1502/13/21/24,*4406/12,*5301-06,*5104*8301	B*35; 07; 15; 44; 51; 53; 83	369	256

Folha de interpretação de resultados (3/4)

Mix	HLA	Alelo	Serotipo	ampl	contr **
57	B	B*3501-37 except *3501/19/25-27,*18,*7801-04,*1522/59,*5305,*5606	B*35; 18; 78; 15; 53; 56	128	256
58	B	B*3701,*4406,*5108	B*37; 44; 51	606	256
59	B	B*4001-34 except *4012/14/17/21/28,*4701-03	B*40; 47	544	256
60	B	B*4001/07/14-16/22N/23/25/30-34,*27053,*3907	B* 40; 27; 39	784	256
61	B	B*4001/10/12/14-16/21/22N/23/25/30-34,*4801/03/05/07,*0702/04-07/09-12/14/15/17/18/20/22-24,*8101	B*40; 48; 07; 81	608	256
62	B	B*4101-05,*4202,*4405/18,*4501-03,*5002,*27053,*3907	B*41; 42; 44; 45; 50; 27; 39	781	256
63	B	B*4201/02,*0801-12,*3510,*3907	B*42; 08; 35; 39	702	256
64	B	B*4601/02	B*46	459	256
65	B	B*4701-03,*2718,*3702	B*47; 37; 27	414	256
66	B	B*5401/02,	B*54	508	256
67	B	B*7301	B*73	289	256
68	B	B*7801-04,*1509/012,*4026/28,*5605/06	B*78; 15; 40; 56	400	256
69	B	Bw4	B*08; 13; 15; 18; 27; 37; 38; 44; 47; 49; 51; 52; 53; 57; 58; 59	180	256
70	B	Bw6 not B*5401	B*07; 08; 13; 14; 15; 18; 35; 39; 40; 41; 42; 45; 46; 47; 48; 50; 54; 55; 56; 67; 78; 81; 82; 83	180	256