

HLA-DRDQ Box 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

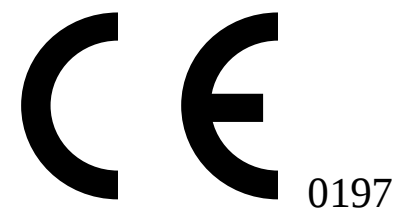
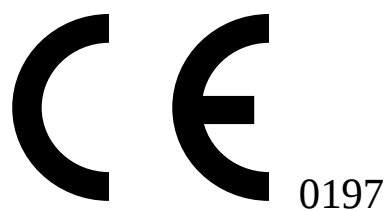
biocant – centro de inovação em biotecnologia
núcleo 4, lote 3
3060-197 cantanhede
portugal

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

Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO



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



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

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

Referências

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. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992; 39: 225-35.
5. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*. 1993; 41: 119-34.

Índice

Apresentação.....	4
Alterações e Melhoramento do produto.....	4
Controlo da Qualidade	5
Validação – Linhas Celulares.....	6
Componentes do HLA-DRDQ Box 1.0 Typing Kit.....	8
Protocolo de amplificação por PCR.....	9
Reagentes.....	9
Extracção de DNA.....	9
Amplificação por PCR	9
Parâmetros do programa de PCR.....	10
Protocolo de electroforese em gel de agarose.....	11
Preparação do gel a 2%.....	11
Electroforese.....	11
Esquema da placa HLA-DRDQ Box 1.0	12
Identificação da placa HLA-DRDQ Box 1.0	13
Folha de interpretação dos Resultados.....	14
Tabela de interpretação dos Resultados	16
Guia de resolução de problemas	17
Avisos e precauções.....	18
Guia técnico.....	19
Garantia.....	20
Aviso de Garantia.....	21
Declaração de Conformidade	22
Folha de dados de segurança.....	23
Referências.....	26

Apresentação

Este kit contém placas com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética de baixa resolução dos genes do HLA-DR e HLA-DQ.

Alterações e melhoramento do Produto

O kit HLA-DRDQ 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 (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 a seguras 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.

Controlo de Qualidade

Foram usadas amostras de DNA de 51 linhas celulares constantes do *IHWG Sequence Polymorphism Reference DNA SSOP Panel* e 38 linhas celulares constantes do *IHWG Sequence Polymorphism Reference DNA DQ/DP 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 (1-2)

HLA-DR low resolution SSP typing kit					
Cell line		Cell Typing			HLA-DRB1* Positive well no.
		HLA-A*	HLA-B*	HLA-DRB1*	
9215	M7	0202;0301	3501;5301	03011;0701	6/7/8/12
9273	LADA	0201;8001	0702;5703	09012;1201	14/19/20
9263	G085	0101;2901	4006;5201	1404;15021	9/24/25/27/28
9373	FH1	0205;6802	1402;5801	1302;0102	1/2/5/9/10/18/21
9030	JHAF	31012	51011	0407	11
9035	JBush	3201	3801	1101	16/17
9045	TUBO	0206;0301	51011	1201;1104	16/17/19/20
9220	XLI-ND	0210;3001	1302;4006	0701;09012	12/14
9077	T7527	0207	4601	0901;12	14/19/20
9085	EJ32B	3002	1801	03011	6/7/8
9103	KT14	2402;2602	4006;51011	09012	14
9374	FH2	3401;0201	4001;4402	1302;1301	9/10/18/21
9375	FH3	3301;3101	1402;3502	1101;1104	16/17
9364	GRC202	0211;68012	3505;4004	0411;09012	11/14
9371	ISH4	0218;1101	1501;4601	04;08	11/13
9368	280599	2604;2402	3901;3802	0901;1501	14/27/28
9367	LCK	0203;1102	38021;4601	0901	14
9394	BPO7	0201	0703;15	1301;15011	10/18/21/27/28
9048	LBUF	3001	1302	07011	12
9032	BSM	0201	1501	0401	11
9237	APA	1101;2403	1502;5502	15011;1405	9/24/25/27/28
9253	THA1742	2403;3303	1512;4601	0406;12021	11/19/20
9369	ISH3	2402	1526N	0406	11
9380	FH6	2402;2901	2702;0705/6	1001;1601	15/29/30
9376	FH4	0101	2703;2705	07;11	12/16/17/18
9266	PAR	11011;2402	2706;4801	15021;11011	16/17/27/28
9377	FH5	2902;0201	2709;4403	1401;07	9/12/24/25
9068	BM9	0201	3501	0801	13
9056	K0SE	0201	3503	1302;1401	9/10/18/21/24/25
9009	KAS011	0101	3701	1601	29/30
9381	FH7	0206;3002	3908;1801	0315;04071	7/8/11
9385	FH11	0301;2902	4404;07021	0101;1101	1/2/4/16/17
9047	PLH	0301	4701	0701	12
9392	GN00218	0301;2902	4703	-	-
9040	BM15	0101	4901	1102	16/17/18
9092	BM92	2501	51011	0404	11
9370	230699	0206;2402	5103;07021	0101;0405	1/2/4/11
9372	ISH5	2402	5401;4801	0901;1405	14/24/25
9052	DBB	0201	5701	0701	12
9267	LE023	6601;3201	7301;51011	1301;1302	9/10/18/21
9382	FH8	11011;3402	8201;27052	07;1503	12/27/28
9366	Daudi	0102;6601	5801;5802	1301;1302	9/10/18/21
9014	MGAR	2601	0801	1501	27/28
9053	HOR	3303	44031	1302	9/10/18/21
9021	RSH	3001;6802	4201	03021	6/7
9024	KT17	0201;1101	15011;3501	0406	11
9016	RML	0204	51011	1602	29/30
9297	HAG	02011	4102	1303	22
9386	FH12	0225;1101	4402;27052	1201;0404	11/19/20
9387	FH13	3402;6802	44031;1501	1503;0301	6/7/8/27/28
9398	FH18	7401;3601	5301;5703	0804;1303	22

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 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	Ácido 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

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-DRDQ BOX 1.0

Numero do Produto: GB.02.06

Utilização: Tipagem de baixa resolução das moléculas de HLA-DR e HLA-DQ.

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

Validação - Linhas Celulares (2-2)

HLA-DQ low resolution SSP typing kit				
Cell line	Cell Typing			HLA-DQB1* Positive well no.
	HLA-DQA1*	HLA-DQB1*	DPB1*	
IHW09008	0102	0602; 0603	02012;2301	45/46
IHW09009	01022	0502	0401;1401	44
IHW09016	05013	0301	0402	42
IHW09021	0401	0402	01011;0402	43
IHW09023	05011	0201	0101	39
IHW09041	0501	0301	0402;1101	42
IHW09047	0201	0201	1501	39
IHW09055	0102	0609	0501	46
IHW09056	0104;0102	0503;0604	02012;1301	44/46
IHW09060	0103	0603	1901	45/46
IHW09064	0503	0301	0501	42
IHW09076	0302	03032	0401;1001	41
IHW09095	0201	0201;03032	0201;0301	39/41
IHW09107	03	0401	1801;5801	43
IHW09138	03;0201	0302;0201	1301;2801	39/40
IHW09151	0104;0201	0201;0501	1601;2201	39/44
IHW09175	03;0201	0201;0402	0401;2101	39/43
IHW09189	0102;0302	06;0303	02012;3201	41/45
IHW09193	0103	0601	02012	45
IHW09198	0102;0601	0301;0502	0501;3101	42/44
IHW09200	0501;0104	0501;0301	0401;3001	42/44
IHW09263	0103;0104	05031;0601	0301;1701	44/45
IHW09286	0103	06011	0901	45
IHW09314	0102;03	0605;0302	0201	40/45/46
IHW09323	0101	0501	02012;0402	44
IHW09348	0103;0101	0501;0603	0401;4601	44/45/46
IHW09349	03;0501	0304;0301	0201;20011	42
IHW09366	-	0604;0602	0401;4501	45/46
IHW09367	03	03032	02012;1901	41
IHW09373	0101;0102	0501;0609	0501	44/46
IHW09375	0505	0301;0301	0301;0402	42
IHW09376	0102;0201	0202;0602	0401;0501	39/45
IHW09377	0104;0201	05031;0202	02012;1401	39/44
IHW09381	0301;0501	0201;0302	0401;11011	39/40
IHW09388	0301;0302	0301;0302	0401;0402	40/42
IHW09397	01;0401	0501;0301	0101;2701	42/44
IHW09404	-	0302;0201	5101;02012	39/42

Componentes do HLA-DRDQ Box Typing Kit

- **Placas de tipagem de baixa resolução de HLA-DR e DQ⁺ (24 tipagens)**

12 placas (2 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 de PCR transparentes

- **Manual de instruções**

1 Manual de Instruções

⁺ com pares de primers específicos desidratados (47 pares de primers e 1 controlo negativo).

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

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 expresso 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-DRDQ Box apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

1. Placa 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.

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/descongelação, 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).

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:
 - **153 μl da PCR Master Mix,**
 - **308 μl de dd H₂O e**num tubo de 0,7 ml ou 1,5 ml.
3. Agite vigorosamente durante 15s.
4. Pipete **10 μl** da mistura para o poço do controlo negativo.
5. Adicione á mistura de reacção, **40 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 47 poços.
8. Repita os passos anteriores com outra amostra de DNA, de modo a completar a placa de tipagem DRDQ.

9. 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	96 °C	25 seg	5
Emparelhamento	70 °C	45 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Denaturação	96 °C	25 seg	21
Emparelhamento	65 °C	45 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Denaturação	96 °C	25 seg	4
Emparelhamento	55 °C	1 min	
Extensão	72 °C	2 min	
Extensão	72 °C	10 min	1
Guardar (opcional)	4 °C	25 seg	1

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

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HLA-DRDQ 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-DRDQ 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-DRDQ 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.

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 minutos, 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 (1-2)** para interpretar os resultados.

Esquema da placa HLA-DRDQ Box 1.0

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

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 Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repurifique a amostra de DNA Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
Os controlos internos falharam em diversos poços	Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA	Repurifique a amostra de DNA Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	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 ddH_2O de forma a obter a concentração exacta Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
		Limpe a zona de trabalho Trabalhe em zonas Pré e Pós-PCR separadas Utilize batas distintas para a zona Pré e Pós-PCR
		Mude de luvas frequentemente 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	
Esfregaço de bandas	Degradação da amostra de DNA	Reextraia a amostra de DNA de material fresco Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	Amostra de DNA muito concentrada	Verifique a qualidade e concentração do DNA Dissolva o DNA em ddH_2O de forma a obter a concentração exacta Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
	Problemas com tampão de electroforese: Fora de prazo ou composição errada	Use um tampão recomendado novo

Tabela de interpretação de resultados

Tubo n°	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
Poço	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4
	a	b	c	d	e	f	g	h	a	b	c	d	e	f	g	h	a	b	c	d	e	f	g	h	a	b	c
Banda Especifica	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2
	5	5	5	0	0	5	5	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	0	5	0	0	0	5	5	0
DRB1*01	+	+	*		*												*	*				*					
DRB1*03							+	+	+	*	+							*	*			*					
DRB1*04										*	+							*				*					
DRB1*07												+											*				
DRB1*08										*			+						*						*		
DRB1*09													+							*							
DRB1*10														+													
DRB1*11								*		*						+	+	*			*		*	*	*	*	*
DRB1*12																	*	*	+	+							
DRB1*13								*	+	*		*							+		+	+	*		*		
DRB1*14								+	+	*		*					*	*	*			*	*	+	+	+	
DRB1*15										*																	+
DRB1*16								*															*				
DRB5*01																											
DRB5*02																											
DRB3*01																											
DRB3*02																											
DRB3*03																											
DRB4*01																											

Tubo n°	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Poço	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	d	e	f	g	h	a	b	c	d	e	f	g	h	a	b	c	d	e	f	g	h	a	b	c	d	e	f
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Banda Específica	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DRB1*01	1	2	1	0	1	1	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DRB1*03	5	0	5	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DRB1*04																											
DRB1*07																											
DRB1*08																											
DRB1*09																											
DRB1*10																											
DRB1*11																											
DRB1*12																											
DRB1*13																											
DRB1*14																											
DRB1*15	+		*																								
DRB1*16		+	+	*	+																						
DRB5*01					+																						
DRB5*02						+																					
DRB3*01								+																			
DRB3*02									*	+	+																
DRB3*03									+		+																
DRB4*01																											+

* Positivo para alguns subtipos.

Identificação da placa HLA-DRDQ Box 1.0

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

Folha de interpretação de resultados (1/2)

Mix	HLA	Alelo	Serotipo	Ampl	Contr**
1a	7a	DR	DRB1*0101-03/05/06, *1109, *1306	255	790
1b	7b	DR	DRB1*0101/021/022/04/05	195	790
1c	7c	DR	DRB1*0103	195	790
1d	7d	DR	DRB1*0101/03/05, *1109	250	790
1e	7e	DR	DRB1*01021, 01022	250	790
1f	7f	DR	DRB1*0301-03/05-08/10-13/16	155	790
1g	7g	DR	DRB1*0301-10/12-16, *1107	215	790
1h	7h	DR	DRB1*0301/04/06/08/10-13/15/16, *1327	220	790
2a	8a	DR	DRB1*0302/05/14, *1109/20, *1302/05/26/29/31/34/36/39/41, *1402-03/09/13/19/24/27/30, *1608	190	790
2b	8b	DR	DRB1*0301-07/09/11/14-17, *0414, *08042/20, *1301-02/05-11/14-36/18-20/22-25/27-29/34-37/40-42/44, *1402/03/06/09/12/14/17/19-21/23/24/27/29/30/33/36	170	790
2c	9c	DR	DRB1 *0401-22/24-33/35/36, *1109/10/21/22, *1306, *1410, *15022	260	790
2d	8d	DR	DRB1 *0701, *0703	235	790
2e	8e	DR	DRB1 *0801-06/09/10/12/13/16/17/18/22, *1317, *1415	165	790
2f	8f	DR	DRB1 *0901	235	790
2g	8g	DR	DRB1 *1001	205	790
2h	8h	DR	DRB1 *0308, *1101-04/06-21/23-29/32/34/36/37/39/41	175	790
3a	9a	DR	DRB1*0308, 1101-21/23-29/32/34/36/37/39/41, *1204, *1411	175	790
3b	9b	DR	DRB1 *0414, *1102/03/11/14/16/20/21/36/41, *13011/021/04/08/15-17/19/20/22-24/27-29/31/32/34-36/38-41/43/45/46, *1141, *1204, *1411/16	215	790
3c	9c	DR	DRB1 *0812/22, *1201-06 excepto *1203, *1428	250	790
3d	9d	DR	DRB1 *1201-03/05/06	165	790
3e	9e	DR	DRB1*1116/20, *1301/02/15/16/27/28/31/32/34-36/39/41	130	790
3f	9f	DR	DRB1*0312, *0409, *1303/04/12/13/21/30/32/33/38, *1413	170	790
3g	9g	DR	DRB1*1109, *1305/18/26/42, *1427, *1608	130	790
3h	9h	DR	DRB1*0809/21, *1117, *1318, *14011/03-05/07/08/10-12/14/15/18/23/26-28/35/36	165	790
DNA 1	DNA 2				

Folha de interpretação de resultados (2/2)

Mix	HLA	Alelo	Serotipo	Ampl	Contr**
4a	10a	DR	DRB1*1117, *14011/04/05/07/08/11/14/18/23/26/28/35/36	255	790
4b	10b	DR	DRB1*1109, *1305/06/42, *1402/06/09/13/17/29/30	145	790
4c	10c	DR	DRB1*15011-22/03/06/07/08/09	200	790
4d	10d	DR	DRB1*1501-09	215	790
4e	10e	DR	DRB1*16011/21/03/05/07/08	220	790
4f	10f	DR	DRB1*1507, *16011-022/03-05/07/08	215	790
4g	10g	DR	DRB5*0202/03, *0106	200	790
4h	10h	DR	DRB5*0101/02/05/07/08N/10N	210	790
5a	11a	DR	DRB5 all	210	790
5b	11b	DR	DRB3*01011/012/014/03-06	175	790
5c	11c	DR	DRB3*0209, *0301-03	175	790
5d	11d	DR	DRB1* 0414, *08042, *1306, *1412, *15022, DRB3*0201-06/10/11/13	175	790
5e	11e	DR	DRB1* 0414, *08042, *1306, *1412, *15022, DRB3*0201-06/09-11/13, *0301-03	175	790
5f	11f	DR	DRB4* 0101-05	215	790
5g	11g	DQ	DQB1*0201-03	200	790
5h	11h	DQ	DQB1*0302/07/08	165	790
6a	12a	DQ	DQB1*0303/06	135	790
6b	12b	DQ	DQB1*0301/04/09/10, *06012?	215	790
6c	12c	DQ	DQB1*0401/02	210	790
6d	12d	DQ	DQB1*0501-04	215	790
6e	12e	DQ	DQB1*0601-03/052/06/08/10/11/13/14/16	255	790
6f	12f	DQ	DQB1*0603-09/112/12/14/17	180	790
6g	12g	DQ	Controlo positivo		790
6h	12h	DQ	Controlo negativo		
DNA 1	DNA 2				

**Os pares de primers controlo emparelham com sequências não polimórficas. Os primers de controlo positivo interno amplificam segmentos do gene PIC1, originando fragmentos com 790 pares de bases.
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.