

Referências

1. Almawi WY, Tamim H, Kreidy R, Timson G, Rahal E, Nabulsi M, Finan RR, Irani-Hakime N. A case control study on the contribution of factor V- Leiden, prothombin G20210A, and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of deep venous thrombosis. *J Thomb thrombolysis*. 2005; 19(3): 189-96.
2. Mueller T, Marschon R, Dieplinger B, Haidinger D, Gegenhuber A, Poelz W, Webersinke G, Haltmayer M. factor V Leiden, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutatioes are not associates With chronic limb ischemia: the Linz peripheral arterial disease (LIPAD) study. *J Vasc Surg*. 2005; 41(5): 808-15.
3. Kim OJ, Hong SP, Ahn JY, Hong SH, Hwang TS, Kim SO, Yoo W, Oh D, Kim NK. Influence of combined methionine syntetase (MTR 2756 A>G) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 677 C>T) polymorphisms in korean patients with ischemic stroke. *Yonsei Med J*. 2007; 48(2): 201-9



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

MTHFR C677T Box 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

Versão1.3; Maio de 2010



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

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 acidental

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	4
Componentes do MTHFR Box 1.0 Typing Kit.....	5
Protocolo de amplificação por PCR.....	6
Reagentes.....	6
Extracção de DNA.....	6
Amplificação por PCR	6
Parâmetros do programa de PCR.....	7
Protocolo de electroforese em gel de agarose.....	8
Preparação do gel a 2%.....	8
Electroforese.....	8
Esquema da tira MTHFR Box 1.0	9
Identificação da tira MTHFR Box 1.0	9
Tabela de interpretação dos Resultados	10
Guia de resolução de problemas	11
Avisos e precauções.....	12
Guia técnico	13
Garantia	14
Aviso de Garantia	15
Declaração de Conformidade CE.....	16
Folha de dados de segurança.....	17
Referências	20

Apresentação

Este kit contém tiras com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética do polimorfismo 677 do gene MTHFR.

Alterações e melhoramento do Produto

Este produto pode 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		

Controlo de Qualidade

Devido à inexistência de linhas celulares controlo não foram feitos testes normais de controlo da qualidade. Contudo, a Genebox testou as misturas de primers com vários DNAs padrão obtendo amostras positivas e negativas para cada uma das mutações. A Genebox garante a qualidade e a fiabilidade do seu kit MTHFR Box.

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 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: MTHFR Box

Numero do Produto: GB.02.07

Utilização: Tipagem genética do gene MTHFR.

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*, conformidade de acordo com o Anexo IV, transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia. Europeia.

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



Sandra Balseiro
Directora Técnica

Componentes do MTHFR Box 1.0 Typing Kit

- **Tiras de tipagem de MTHFR⁺** (48 tipagens)
12 tiras (48 amostras) (conservar de -15 a -30°C)
- **PCR Master Mix (com Taq DNA Polimerase)**
1 X 340 µl (conservar de -15 a -30°C)
- **Selantes das tiras**
12 cápsulas selantes
- **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:
 - **7 μl da PCR Master Mix,**
 - **15 μl de água bi-destilada estéril e**
 - **2 μl da amostra de DNA (conc. 100-200 ng/μl)**num tubo de 0,7 ml ou 1,5 ml.
3. Agite vigorosamente durante 15 segundos.
4. Pipete **10 μl** da mistura para cada poço da tira de tipagem (**2 pares de primers**).
5. Repita os passos anteriores para cada uma das amostras DNA (num total de 4 amostras por tira).
6. Sele a tira de tipagem com a cápsula e coloque num aparelho PCR de 96 poços.

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 expreso 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 MTHFR 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 evitadas 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).

Parâmetros do programa PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	96 °C	1 min	1
Desnaturação	96 °C	25 seg	5
Emparelhamento	70 °C	45 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Desnaturação	96 °C	25 seg	21
Emparelhamento	65 °C	45 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Desnaturação	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	Infinito	1

- No final da PCR guarde a placa a 2-8 °C.
- 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 2 µl 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** para interpretar os resultados.

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o MTHFR 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 MTHFR 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 MTHFR 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

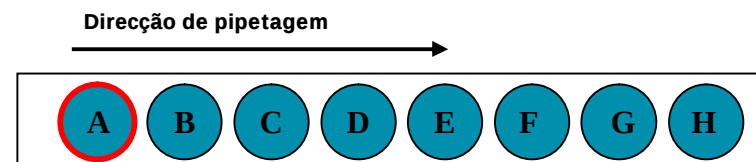
A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença 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.

Esquema da tira MTHFR Box 1.0



Identificação da tira MTHFR Box 1.0

Posição				Gene	Local polimórfico
A	C	E	G	MTHFR	677
B	D	F	H	MTHFR	677

Tabela de interpretação de resultados

Linha	Poço				Gene	Polimorfismo	Aminoácido	Banda específica	Banda Controlo**
1	A	C	E	G	MTHFR	677	T	302	790
	B	D	F	H	MTHFR	677	C	302	790
	DNA 1	DNA 2	DNA 3	DNA 4					

****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.

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

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 $\mu\text{H}_2\text{O}$ 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 $\mu\text{H}_2\text{O}$ 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