

Referências

1. Turner MS, Penning S, Sharp A, Hyland VJ, Harris R, C. Morris P, van Daal A. Solid-Phase Amplification for Detection of C282Y and H63D Hemochromatosis (HFE) Gene Mutations *Clinical Chemistry*. 2001; 47: 1384–1389.
2. Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, Powell LW, Heath AC, Zhu G, Duffy DL, Martin NG. Effects of HFE C282Y and H63D Polymorphisms and Polygenic Background on Iron Stores in a Large Community Sample of Twins. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 1246–1258
3. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2001; 154: 193-206.
4. Koppel H, Krippel P, Gasser R, Wascher TC, Paulweber B, Pilger E, Renner W. Hemochromatosis gene (HFE) polymorphisms are not associated with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost* 2004; 91:1258-9.
5. Douabin V, Moiraind R, Jouanolle AM, Brissot P, Gall JY, Deugnier Y, David V. Polymorphisms in the HFE gene. *Hum Hered.*1999; 49:21-26
6. Biasiotto G, Belloli S, Ruggeri G, Zanella I, Gerardi G, Corrado M, Gobbi E, Albertini A, Arosio P. Identification of new mutation of the HFE, hepcidin and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload. *Clinical Chemistry*. 2003 49: 1981-1988
7. Steiner M, Ocran K, Genschel J, Meier P, Gerl H, Schneider ML, Butter C, Wadowska K, Kerner W, Schuff-Werner P, Lochs H, Schmidt H. A homozygous HFE gene splice site mutation (IVS5+1 G/A) in a hereditary hemochromatosis patient of Vietnamese origin. *Gastroenterology*. 2002; 122(3):789-95
8. Toomajian C, Kreitman M. Sequence Variation and Haplotype Structure at the Human HFE Locus. *Genetics*. 2002; 161: 1609-1623



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



HFE Box 2.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

Versão 1.5; Maio de 2010.

Índice

Apresentação	3
Alterações e melhoramento do Produto	3
Controlo da Qualidade	3
Componentes do HFE Box 2.0 Typing Kit	4
Protocolo de amplificação por PCR.....	5
Reagentes.....	5
Extracção de DNA.....	5
Amplificação por PCR	5
Parâmetros do programa de PCR	6
Protocolo de electroforese em gel de agarose	7
Preparação do gel a 2%.....	7
Electroforese.....	7
Esquema da placa HFE Box 2.0	8
Identificação da placa HFE Box 2.0.....	8
Tabela de interpretação dos Resultados.....	9
Guia de resolução de problemas.....	10
Avisos e precauções.....	11
Guia técnico.....	12
Garantia.....	13
Aviso de Garantia.....	14
Declaração de Conformidade CE.....	15
Folha de dados de segurança	16
Referências.....	20

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 inapropriada 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)

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.

Apresentação

Este kit contém placas com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética dos polimorfismos dos codões 63 e 262, dos intrões 1, 2, 4, 5 e UTR do HFE.

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

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 HFE Box.

Componentes do HFE Box 2.0 Typing Kit

- **Placas de tipagem de HFE⁺** (48 tipagens)
12 placas (4 amostras cada) (conservar de -15 a -30 °C)
- **PCR Master Mix (com Taq DNA Polimerase)**
12 X 320 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

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

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™
Manufacturação: 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	liquido	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.

6. Protecção pessoal.

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

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

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: HFE Box 2.0

Numero do Produto: GB.11.06

Utilização: Tipagem genética do gene HLA-H ou HFE.

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

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:
 - **78 μl da PCR Master Mix,**
 - **160 μl de água bi-destilada estéril 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, **22 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 23 poços.
8. Sele a placa de tipagem com um autocolante e coloque num aparelho PCR de 96 poços.

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%.
- Use a **Tabela de interpretação de resultados** para interpretar os resultados

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 HFE 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 electroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 2%

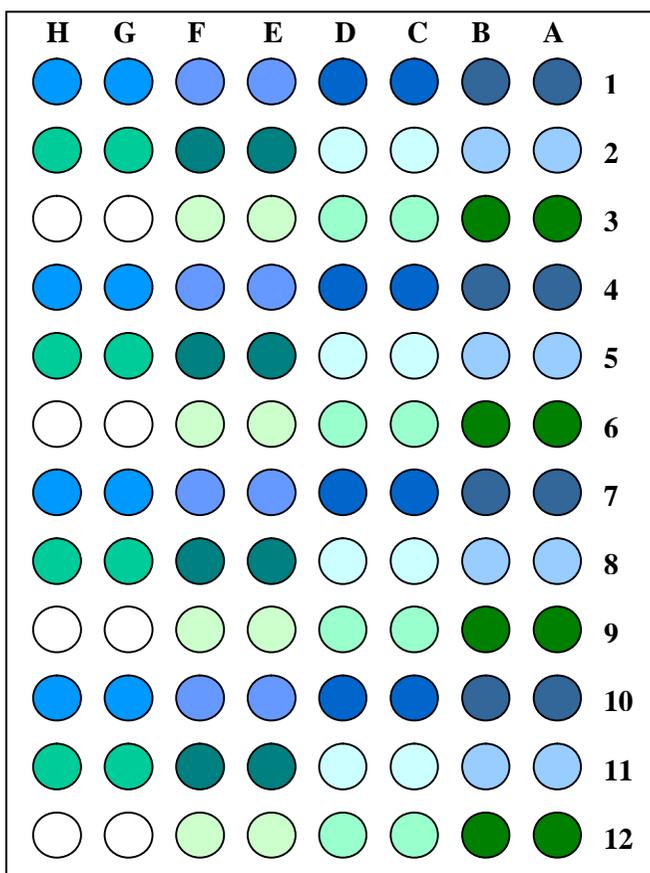
1. Dissolver **4 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
2. Dissolver completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
3. Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50°C.
4. Adicione pelo menos **20 µl de brometo de etídio⁺⁺** (10 mg/ml) **ou 2 µl de Sybr Safe** (10000x concentrado 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.

Esquema da placa HFE Box 2.0



Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HFE Box 2.0 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 HFE Box 2.0 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 HFE Box 2.0 Typing Kit™ é obrigatório 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**

Identificação da placa HFE Box 2.0

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 descreminadas 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 saís 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.

Posição (amostra 1)	Posição (amostra 2)	Posição (amostra 3)	Posição (amostra 4)	Gene	Local polimórfico
1A	4A	7A	10A	HFE	URT 1476
1B	4B	7B	10B	HFE	URT1476
1C	4C	7C	10C	HFE	UTR 2591
1D	4D	7D	10D	HFE	UTR 2591
1E	4E	7E	10E	HFE	Intrão 1
1F	4F	7F	10F	HFE	Intrao1
1G	4G	7G	10G	HFE	Intrão1
1H	4H	7H	10H	HFE	Intrao 1
2A	5A	8A	11A	HFE	Intrão 1
2B	5B	8B	11B	HFE	Intrão 1
2C	5C	8C	11C	HFE	Intrão 2
2D	5D	8D	11D	HFE	Intrão 2
2E	5E	8E	11E	HFE	Intrão 3
2F	5F	8F	11F	HFE	Intrão 3
2G	5G	8G	11G	HFE	Intrão 4
2H	5H	8H	11H	HFE	Intrão 4
3A	6A	9A	12A	HFE	Intrão 5
3B	6B	9B	12B	HFE	Intrão 5
3C	6C	9C	12C	HFE	Codão 63
3D	6D	9D	12D	HFE	Codão 63
3E	6E	9E	12E	HFE	Codão 282
3F	6F	9F	12F	HFE	Codão 282
3G	6G	9G	12G	CP	-----
3H	6H	9H	12H	CN	-----

Tabela de interpretação de resultados (1/1)

Mistura	Mistura	Mistura	Mistura	Gene	Polimorfismo	Alelo	Banda específica	Banda controlo**
1A	4A	7A	10A	HFE	URT 1476	C	269	790
1B	4B	7B	10B	HFE	URT 1476	T	269	790
1C	4C	7C	10C	HFE	UTR 2591	G	176	790
1D	4D	7D	10D	HFE	UTR 2591	A	176	790
1E	4E	7E	10E	HFE	Intrão 1	A	218	790
1F	4F	7F	10F	HFE	Intrão 1	T	218	790
1G	4G	7G	10G	HFE	Intrão 1	C	211	790
1H	4H	7H	10H	HFE	Intrão 1	T	211	790
2A	5A	8A	11A	HFE	Intrão 1	C	181	790
2B	5B	8B	11B	HFE	Intrão 1	T	181	790
2C	5C	8C	11C	HFE	Intrão 2	A	259	790
2D	5D	8D	11D	HFE	Intrão 2	G	259	790
2E	5E	8E	11E	HFE	Intrão 3	C	287	790
2F	5F	8F	11F	HFE	Intrão 3	T	287	790
2G	5G	8G	11G	HFE	Intrão 4	C	188	790
2H	5H	8H	11H	HFE	Intrão 4	T	188	790
3A	6A	9A	12A	HFE	Intrão 5	G	329	790
3B	6B	9B	12B	HFE	Intrão 5	A	329	790
3C	6C	9C	12C	HFE	Codão 63	C	274	790
3D	6D	9D	12D	HFE	Codão 63	G	274	790
3E	6E	9E	12E	HFE	Codão 282	G	258	790
3F	6F	9F	12F	HFE	Codão 282	A	258	790
3G	6G	9G	12G	HFE	CP	-	-	790
3H	6H	9H	12H	HFE	CN	-	-	-
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 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
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
Degradação da amostra de DNA		Mude de luvas frequentemente Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade
Esfregação 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 dH_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