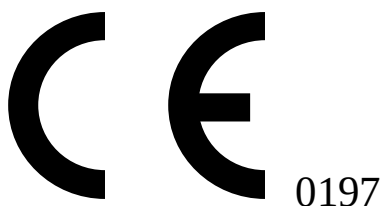


## Referências

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. 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.



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](mailto:info@genebox.com)  
[www.genebox.com](http://www.genebox.com)

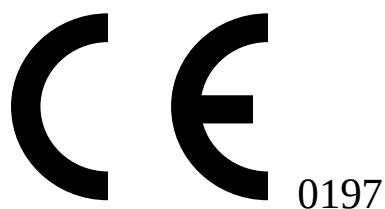
# HLA-A single 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

## Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO  
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO



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](mailto:info@genebox.com)  
[www.genebox.com](http://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 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 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 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-A Single 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-A B single 1.0 .....         | 11 |
| Identificação da placa HLA-A single 1.0 .....     | 12 |
| Folha de interpretação dos Resultados.....        | 13 |
| Tabela de interpretação dos Resultados .....      | 14 |
| Guia de resolução de problemas .....              | 15 |
| Avisos e precauções.....                          | 16 |
| Guia técnico.....                                 | 17 |
| Garantia.....                                     | 18 |
| Aviso de Garantia.....                            | 19 |
| Declaração de Conformidade .....                  | 20 |
| Folha de dados de segurança.....                  | 21 |
| Referências.....                                  | 24 |

## 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.

## Alterações e melhoramento do Produto

O kit HLA-A single 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 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<br>Vermelho de Cresol                                                                                 | Oligonucleótido                         |
| Mistura de reacção | Desoxiribonucleótidos<br>Tampão NH <sub>4</sub><br>Cloreto de Magnésio<br>Vermelho de Cresol<br>Glicerol<br>Taq DNA Polimerase | Nucleótidos<br>MgCl <sub>2</sub><br>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)<br>LD50= oral 12600 mg/kg (rato)<br>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:** HLA-A

**Numero do Produto:** GB.12.06

**Utilização:** Tipagem de baixa resolução das moléculas de HLA-A.

**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-A baixa resolução |         |                 |                        |
|------------------------------------------|---------|-----------------|------------------------|
| Linha celular                            |         | Tipagem celular | HLA-A                  |
|                                          |         | HLA-A*          | Nº dos poços positivos |
| 9215                                     | M7      | 0202;0301       | 3/4/25/36              |
| 9273                                     | LADA    | 0201;8001       | 3/24/25/26             |
| 9263                                     | G085    | 0101;2901       | 1/17/23/26             |
| 9373                                     | FH1     | 0205;6802       | 3/13/15/25             |
| 9030                                     | JHAF    | 31012           | 19/23/26               |
| 9035                                     | JBush   | 3201            | 20/22/26               |
| 9045                                     | TUBO    | 0206;0301       | 3/4/25/26              |
| 9220                                     | XLI-ND  | 0210;3001       | 3/18/25/26             |
| 9077                                     | T7527   | 0207            | 3/25                   |
| 9085                                     | EJ32B   | 3002            | 18/26                  |
| 9103                                     | KT14    | 2402;2602       | 6/8/9/25/26            |
| 9374                                     | FH2     | 3401;0201       | 3/10/25/26/28          |
| 9375                                     | FH3     | 3301;3101       | 19/21/23/26            |
| 9364                                     | GRC202  | 0211;68012      | 3/13/14/25             |
| 9371                                     | ISH4    | 0218;1101       | 3/12/25/26             |
| 9368                                     | 280599  | 2604;2402       | 6/8/9/25/26            |
| 9367                                     | LCK     | 0203;1102       | 3/12/25/26             |
| 9394                                     | BPOT    | 0201            | 3/25                   |
| 9048                                     | LBUF    | 3001            | 18/26                  |
| 9032                                     | BSM     | 0201            | 3/25                   |
| 9237                                     | APA     | 1101;2403       | 6/12/25/26             |
| 9253                                     | THA1742 | 2403;3303       | 6/21/23/25/26          |
| 9369                                     | ISH3    | 2402            | 6/25                   |
| 9380                                     | FH6     | 2402;2901       | 6/17/23/25/26          |
| 9376                                     | FH4     | 0101            | 1/26                   |
| 9266                                     | PAR     | 11011;2402      | 6/12/26/25             |
| 9377                                     | FH5     | 2902;0201       | 3/17/23/25/26          |
| 9068                                     | BM9     | 0201            | 3/25                   |
| 9056                                     | K0SE    | 0201            | 3/25                   |
| 9009                                     | KAS011  | 0101            | 1/26                   |
| 9381                                     | FH7     | 0206;3002       | 3/18/25/26             |
| 9385                                     | FH11    | 0301;2902       | 4/17/23/26             |
| 9047                                     | PLH     | 0301            | 4/26                   |
| 9392                                     | GN00218 | 0301;2902       | 4/17/23/26             |
| 9040                                     | BM15    | 0101            | 1/26                   |
| 9092                                     | BM92    | 2501            | 7/9/26/27              |
| 9370                                     | 230699  | 0206;2402       | 3/6/25                 |
| 9372                                     | ISH5    | 2402            | 6/25                   |
| 9052                                     | DBB     | 0201            | 3/25                   |
| 9267                                     | LE023   | 6601;3201       | 9/10/20/22/26/27       |
| 9382                                     | FH8     | 11011;3402      | 12/14/26/28            |
| 9366                                     | Daudi   | 0102;6601       | 1/9/10/26/27           |
| 9014                                     | MGAR    | 2601            | 8/26/27                |
| 9053                                     | HOR     | 3303            | 21/23/26               |
| 9021                                     | RSH     | 3001;6802       | 13/15/18/25/26         |
| 9024                                     | KT17    | 0201;1101       | 3/12/25/26             |
| 9016                                     | RML     | 0204            | 3/25                   |
| 9297                                     | HAG     | 02011           | 3/25                   |
| 9386                                     | FH12    | 0225;1101       | 3/12/25/26             |
| 9387                                     | FH13    | 3402;6802       | 9/10/13/15/25/26/28    |
| 9398                                     | FH18    | 7401;3601       | 2/22/23/26             |

## 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 expresse 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-A single 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 dH<sub>2</sub>O 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-A single Typing Kit

- **Placas de tipagem de baixa resolução de HLA-A<sup>+</sup> (36 tipagens)**  
12 placas (3 amostras 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 (28 pares de primers e 4 controlos negativos).

## Componentes da PCR Master Mix

### Nucleótidos:

concentração final de cada dNTP é 600 µM

### Tampão da PCR:

concentrações finais são 3,3x NH<sub>4</sub>, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> 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:
  - **102 μl da PCR Master Mix,**
  - **205 μl de dd H<sub>2</sub>O 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, **27 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 29 poços.
8. Repita os passos anteriores para mais 2 amostras de DNA para completar.
9. Sele a placa de tipagem com um autocolante e ponha-a num termociclador de 96 poços.

## Guia Técnico

### 1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o HLA-A single 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-A single 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-A single 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.

## 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      |

- 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<sup>++</sup>** (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.

<sup>++</sup> 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** 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                                                                                                                                                                                                     |
|                                                                        |                                                                                               | Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade                                                                                                                                                                                                                                    |
|                                                                        | Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA                                  | Repurifique a amostra de DNA<br>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<br>Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade                                                                                                                                                                                                    |
|                                                                        |                                                                                               | Verifique a selagem das placas                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                        | Produtos de amplificação secos                                                                | 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<br>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<br>Dissolva o DNA em $\text{ddH}_2\text{O}$ de forma a obter a concentração exacta<br>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<br>Trabalhe em zonas Pré e Pós-PCR separadas<br>Utilize batas distintas para a zona Pré e Pós-PCR<br>Mude de luvas frequentemente<br>Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade                                                                      |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                        | Amostra de DNA muito concentrada                                                              | Reextraia a amostra de DNA de material fresco<br>Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade<br>Verifique a qualidade e concentração do DNA<br>Dissolva o DNA em $\text{ddH}_2\text{O}$ de forma a obter a concentração exacta<br>Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Esfregaço de bandas                                                    | Degradação da amostra de DNA                                                                  | Reextraia a amostra de DNA de material fresco<br>Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade                                                                                                                                                                                   |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                        | Problemas com tampão de electroforese:<br>Fora de prazo ou composição errada                  | Use um tampão recomendado novo                                                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                        |                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

## Tabela de interpretação de resultados

| 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          |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Poço             | 1<br>a<br>b | 1<br>c      | 1<br>d      | 1<br>e      | 1<br>f      | 1<br>g      | 1<br>h      | 2<br>a      | 2<br>b      | 2<br>c      | 2<br>d      | 2<br>e      | 2<br>f      | 2<br>g      | 2<br>h      | 3<br>a      | 3<br>b      | 3<br>c      | 3<br>d      | 3<br>e      | 3<br>f      | 3<br>g      | 3<br>h      | 4<br>a      | 4<br>b      | 4<br>c      | 4<br>d      |             |
|                  | 5<br>a      | 5<br>b      | 5<br>c      | 5<br>d      | 5<br>e      | 5<br>f      | 5<br>g      | 5<br>h      | 6<br>a      | 6<br>b      | 6<br>c      | 6<br>d      | 6<br>e      | 6<br>f      | 6<br>g      | 6<br>h      | 7<br>a      | 7<br>b      | 7<br>c      | 7<br>d      | 7<br>e      | 7<br>f      | 7<br>g      | 7<br>h      | 8<br>a      | 8<br>b      | 8<br>c      | 8<br>d      |
|                  | 9<br>a      | 9<br>b      | 9<br>c      | 9<br>d      | 9<br>e      | 9<br>f      | 9<br>g      | 9<br>h      | 10<br>a     | 10<br>b     | 10<br>c     | 10<br>d     | 10<br>e     | 10<br>f     | 10<br>g     | 10<br>h     | 11<br>a     | 11<br>b     | 11<br>c     | 11<br>d     | 11<br>e     | 11<br>f     | 11<br>g     | 11<br>h     | 12<br>a     | 12<br>b     | 12<br>c     | 12<br>d     |
| Banda específica | 5<br>7<br>4 | 5<br>6<br>3 | 6<br>1<br>3 | 8<br>2<br>6 | 5<br>5<br>5 | 5<br>5<br>5 | 3<br>4<br>8 | 4<br>0<br>0 | 4<br>3<br>8 | 4<br>1<br>7 | 4<br>4<br>0 | 5<br>1<br>8 | 4<br>4<br>5 | 4<br>2<br>6 | 6<br>2<br>3 | 4<br>0<br>5 | 5<br>2<br>5 | 5<br>1<br>5 | 4<br>6<br>0 | 4<br>2<br>1 | 4<br>6<br>1 | 4<br>4<br>4 | 5<br>9<br>1 | 4<br>4<br>3 | 4<br>4<br>6 | 4<br>4<br>4 | 1<br>7<br>0 | 1<br>7<br>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             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             | +           | +           |             |             |

- Positivo para alguns subtipos

## Esquema da placa HLA-A single 1.0

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

## Identificação da placa HLA-A single 1.0

| Posição |    |     | HLA       |
|---------|----|-----|-----------|
| 1a      | 5a | 9a  | A         |
| 1b      | 5b | 9b  | A         |
| 1c      | 5c | 9c  | A         |
| 1d      | 5d | 9d  | A         |
| 1e      | 5e | 9e  | A         |
| 1f      | 5f | 9f  | A         |
| 1g      | 5g | 9g  | A         |
| 1h      | 5h | 9h  | A         |
| 2a      | 6a | 10a | A         |
| 2b      | 6b | 10b | A         |
| 2c      | 6c | 10c | A         |
| 2d      | 6d | 10d | A         |
| 2e      | 6e | 10e | A         |
| 2f      | 6f | 10f | A         |
| 2g      | 6g | 10g | A         |
| 2h      | 6h | 10h | A         |
| 3a      | 7a | 11a | A         |
| 3b      | 7b | 11b | A         |
| 3c      | 7c | 11c | A         |
| 3d      | 7d | 11d | A         |
| 3e      | 7e | 11e | A         |
| 3f      | 7f | 11f | A         |
| 3g      | 7g | 11g | A         |
| 3h      | 7h | 11h | A         |
| 4a      | 8a | 12a | A         |
| 4b      | 8b | 12b | A         |
| 4c      | 8c | 12c | A         |
| 4d      | 8d | 12d | A         |
| 4e      | 8e | 12e | Controlos |
| 4f      | 8f | 12f |           |
| 4g      | 8g | 12g | Vazios    |
| 4h      | 8h | 12h |           |

## Folha de interpretação de resultados

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

\*\* 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.