

Código do Produto: 0107

FACTOR V G1691A (leiden) Box 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*



Manual de Instruções



instituto pedro nunes,
quinta da nora
3030-199 coimbra
Portugal

tel/fax + 351 239 700 930
e-mail info@genebox.com

Índice

Apresentação.....	4
Alterações e melhoramento do Produto.....	4
Controlo da Qualidade	4
Componentes do FACTOR V 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 FACTOR V Box 1.0.....	9
Identificação da tira FACTOR V Box 1.0.....	9
Tabela de interpretação dos Resultados	10
Guia de resolução de problemas	11
Guia técnico.....	12
Garantia	13
Aviso de Garantia.....	14
Declaração de Conformidade CE.....	15
Folha de dados de segurança.....	16
Referências.....	19

Apresentação

Este kit contém tiras com misturas de primers desidratadas e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética do polimorfismo 1691 do gene do FACTOR V de leiden.

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 FACTOR V Box.

Componentes do FACTOR V Box 1.0 Typing Kit

- **Tiras de tipagem de FACTOR V⁺** (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.

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.

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%

- Dissolver **4 gramas** de pó **agarose** em **200 ml** de tampão **TAE 1X**.
- Dissolva completamente a agarose aquecendo-a no microondas.
- Arrefeça o gel até, aproximadamente, 50°C.
- 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.
- Numa superfície nivelada, monte a placa do gel com 96 poços.
- Verta uma camada de gel com cerca de **5mm**.
- Deixe o gel arrefecer.

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

Electroforese

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

Esquema da tira FACTOR V Box 1.0

Direcção de pipetagem →

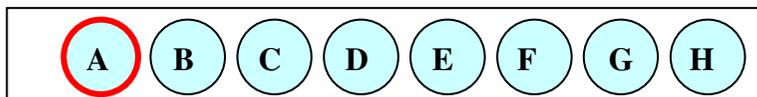


Tabela de interpretação de resultados

Linha	Poço				Gene	Polimorfismo	Aminoácido	Banda específica	Banda Controlo**
	A	C	E	G					
1	B	D	F	H	FACTOR V	1691	A	228	790
	DNA 1	DNA 2	DNA 3	DNA 4					

****Os pares de primers de controlo positivo interno 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.

Identificação da tira FACTOR V Box 1.0

Posição				Gene	Local polimórfico
A	C	E	G	FACTOR V	-1691
B	D	F	H	FACTOR V	-1691

Guia de resolução de problemas

PROBLEMAS

1. As bandas controlo e específicas fracas.
2. Os controlos internos falharam em diversos poços.
3. Falsos negativos de uma banda específica com o controlo interno normal.
4. Detecção de mais de dois alelos específicos
5. Resultados ambíguos
6. Esfregação de bandas

Possíveis Causas

- a) Concentração do DNA baixa.
- b) Degradação do DNA.
- c) Presença de inibidores da Taq polimerase nas amostras de DNA.
- d) Excesso de DNA.
- e) Contaminação com outros produtos de PCR ou outras amostras de DNA durante a preparação do PCR.
- f) O tampão pode aquecer demasiado devido a elevadas voltagens.
- g) Tampão com composição errada.
- h) Tampão velho.

SUGESTÕES

1. Verifique a qualidade e concentração do DNA.
2. Re-purifique o DNA e dilua-o em água desionizada/destilada.
3. Ajuste a concentração do DNA para a desejada.
4. Repita a tipagem com o DNA com maior qualidade.
5. Separe a sala de pré-PCR da de pós-PCR.
6. Vista uma bata diferente para cada sala.
7. Lave bem a zona de trabalho.
8. Mude várias vezes de luvas, especialmente na transição de pós-PCR para pré-PCR.
9. Use o tampão recomendado

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o FACTOR V 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 FACTOR V 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 FACTOR V 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%, devem adicionar óleo mineral à mistura de reacção para que não se verifiquem perdas por evaporação. 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 temperatures 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
+351 239 700 930**

Garantia

geneBOX – investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos garante que os primers presentes no kit de tipagem FACTOR V 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).

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.

Declaração de Conformidade

Nome do Produto: FACTOR V Box

Numero do Produto: GB.01.07

Utilização: Tipagem genética do gene FACTOR V.

Produção: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
Instituto Pedro Nunes,
Quinta da Nora,
3030-199 Coimbra, Portugal

Nós, geneBOX - investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos, indubitavelmente declaramos que este produto, ao qual se relaciona esta declaração de conformidade, está em conformidade com os seguintes documentos normativos, ISO 9001:2000 e ISO 13485:2004. Seguindo ainda, as indicações da Directiva Europeia 98/79/CE, anexo III, sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* transposto para as leis nacionais dos estados membros da União Europeia.

A ficha e os documentos técnicos deste produto são mantidos na geneBOX, Instituto Pedro Nunes, Quinta da Nora, 3030-199 Coimbra, Portugal.

Paulo Santos
Director Técnico

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: Junho de 2007
Grupo do produto: Produtos de tipagem SSP da geneBOX™
Manufaturação: geneBOX - R&D Diagnostic Tests,
Instituto Pedro Nunes,
Quinta da Nora, 3030-199 Coimbra, Portugal
+ 351 239 700 930
tel/fax:
e-mail: info@genebox.com

2. Composição e Informação sobre os reagentes

Componente	Químico	Nome vulgar	Nº de lote
Placa	Acido Desoxiribonucleico	Oligonucleótido	E0505F1149
	Vermelho de Cresol		121613.1604
Mistura de reacção	Desoxiribonucleótidos	Nucleótidos	300495
	Tampão NH ₄		NH-204
	Cloreto de Magnésio	MgCl ₂	MG-204
	Vermelho de Cresol		121613.1604
	Glicerol		16715/1
	Taq DNA Polimerase	Taq	Taq-105

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.

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**, não aplicável.

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.

Folha de Dados de Segurança (3/3)

Material Safety Data Sheet (MSDS)

12. Informação ecológica

Não existem dados disponíveis.

13. Informação sobre a eliminação

Elimine o material de acordo com toda a regulamentação aplicável (Grupo IV – resíduos hospitalares específicos).

14. Informação sobre o transporte

No transporte dos Kits devem estar asseguradas as temperaturas, não devendo ultrapassar os 15°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
+351 239 700 930**

Referências

1. Reid S, Halliday J, Ditchfield M, Ekert H, Byron K, Glynn A, Petrou V, Reddihough D. Factor V Leiden: a contributory factor for cerebral palsy?. *Dev Med Child Neurol.* 2006; 48 (1): 14-9.
2. Wakim-Ghorayeb SF, Keleshian SH, Timson G, Finan RR, Najm P, Irani-Hakime N, Almawi WY. Factor V G1691A single-nucleotide polymorphisms in type 2 diabetes mellitus. *Am J hematomol.* 2005; 80(1): 84-6.
3. Almawi WY, Keleshian SH, Borgi L, Fawaz NA, Abboud N, Mtiraoui N, Mahjoub T. Varied prevalence of factor V G1691A (leiden) and prothrombin G20210A single nucleotide polymorphisms among Arabs. *J thromb thrombolysis.* 2005; 20(3): 163-8.
4. 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.
5. 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



instituto pedro nunes,
quinta da nora
3030-199 coimbra
Portugal

tel/fax + 351 239 700 930
e-mail info@genebox.com