

Referências

1. Lee J., Tsai L, Hwa P, Chan C, Huang A, Chin S, Wang L, Lin J, Linacre A, Hsieh H. A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*.2010; 24: 27–31.
2. Jensen T, Pernasetti FM, Durrant B. Conditions for Rapid Sex Determination in 47 Avian Species by PCR of Genomic DNA From Blood, Shell-Membrane Blood Vessels, and Feathers. *Zoo Biology*. 2003; 22:561–571.
3. García C, Insausti J, Gil J, Frutos A, Alcántara M, González J, Cortés M, Bonafonte J, Arruga M. Comparison of different procedures of DNA analysis for sex identification in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*). *Eur J Wildl Res*. 2009; 55:309–312.
4. Chang H, Gu D, Su S, Chang C, Cheng C, Huang H, Yao C, Chou T, Chuang L, Cheng C. High-throughput gender identification of Accipitridae eagles with real-time PCR using TaqMan probes. *Theriogenology*. 2008; 70: 83–90.
5. Itoh Y, Suzuki M, Ogawa A, Munechika I, Murata K, Mizuno S. Identification of the Sex of a Wide Range of Carinatae Birds by PCR Using Primer Sets Selected from Chicken EE0.6 and Its Related Sequences. *The American Genetic Association*. 2001; 92: 315–321.



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

Sexagem aves Box 1.0 Typing Kit

Dispositivo para utilização *in vitro*

Manual de Instruções



DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO
DE TESTES DE DIAGNÓSTICO

Versão1.0; Outubro de 2011.

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 seguradas 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.



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

2/20

**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	4
Componentes do Sexagem aves 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 4%.....	8
Electroforese.....	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.....	19

Apresentação

Este kit contém misturas de primers e PCR Master Mix para efectuar a tipagem genética dos cromossomas sexuais das aves Z e W. Como é do conhecimento geral as fêmeas apresentam dois cromossomas sexuais, Z e W, enquanto que os machos apenas apresentam um cromossoma sexual, Z. Este kit permite distinguir os dois cromossomas utilizando apenas um par de primers específicos.

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 Sexagem aves Box 1.0, para as seguintes espécies de aves (tabela I):

Tabela I: Listagem de espécies abrangidas pelo kit Sexagem de aves.

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: Outubro de 2011
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
Tira	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
Tira	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.

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: Sexagem Aves Box 1.0

Numero do Produto: GB.03.11

Utilização: Tipagem genética dos cromossomas Z e W de aves

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

Lista de Espécies Sexagem:			
<i>Abroscopus albobularis</i>	<i>Ara severus</i>	<i>Gallus gallus gallus</i>	<i>Psitteuteles iris iris</i>
<i>Accipiter trivirgatus</i>	<i>Arara Jacinta</i>	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>Psittichas fulgidus</i>
<i>Acrocephalus aundinaceus</i>	<i>Balearica pavonina</i>	<i>Garrulax galbanus</i>	<i>Ptilinopus magnificus</i>
<i>Aegithalos concinnus</i>	<i>Balearica pavonina regulorum</i>	<i>Gorsachius melanophus</i>	<i>Pycnonotus melanicterus</i>
<i>Alauda gulgula</i>	<i>Bambusicola fytchii fytchii</i>	<i>Grus japonensis</i>	<i>Pycnonotus sinensis</i>
<i>Alcippe morrisonia</i>	<i>Bambusicola thoracica</i>	<i>Grus antigone</i>	<i>Rhynochetus jubatus</i>
<i>Amazona aestiva</i>	<i>Brachyrampus marmoratus</i>	<i>Heterophasia auricularis</i>	<i>Spheniscus demersus</i>
<i>Amazona aestiva aestiva</i>	<i>Bubulcus ibis</i>	<i>Lanius cristatus</i>	<i>Spilornis cheela</i>
<i>Amazona aestiva xanthopteryx</i>	<i>Bugeraus carunculatus</i>	<i>Lonchura punctulata</i>	<i>Stachyris ruficeps</i>
<i>Amazona albifrons</i>	<i>Calirina moschata</i>	<i>Lonius ludovicianus mearnsi</i>	<i>Streptopelia tranquebarica</i>
<i>Amazona amazonica</i>	<i>Caloenas nicobarica</i>	<i>Lophura swinhoei</i>	<i>Streptopelia chinensis</i>
<i>Amazona auropalliata</i>	<i>Calypotomena viridis continentis</i>	<i>Lorius garrulus</i>	<i>Strix leptogrammica calligata</i>
<i>Amazona autumnalis</i>	<i>Chalcophaps indica</i>	<i>Lorius domicella</i>	<i>Tragopan caboti</i>
<i>Amazona autumnalis lilacina</i>	<i>Charmosyna papou goliathina</i>	<i>Lorius erythrothorax</i>	<i>Tragopan temminckii</i>
<i>Amazona barbadensis</i>	<i>Chrysolophus amherstiae</i>	<i>Lorius lory erythrothorax</i>	<i>Trichoglossus chlorolepidotus</i>
<i>Amazona brasiliensis</i>	<i>Cochoa azurea</i>	<i>Luscinia calliope</i>	<i>Trichoglossus euteles</i>
<i>Amazona dufresiana</i>	<i>Colibri coruscans</i>	<i>Meleagris gallopavo domestica</i>	<i>Trichoglossus haematodus</i>
<i>Amazona farinosa</i>	<i>Columba arquatrix</i>	<i>Merops apiaster</i>	<i>Trichoglossus johnstoniae</i>
<i>Amazona festiva</i>	<i>Columba livia</i>	<i>Merops philippinus</i>	<i>Turdus pallidus</i>
<i>Amazona festiva bodini</i>	<i>Columba oenops</i>	<i>Minla cyanouroptera</i>	<i>Turdus merula</i>
<i>Amazona leucocephala</i>	<i>Columba picazuro</i>	<i>Myiophoneus insularis</i>	<i>Urocissa caerulea</i>
<i>Amazona ochrocephala</i>	<i>Copsychus malabaricus</i>	<i>Ninox scutulata</i>	<i>Vini australis</i>
<i>Amazona oratrix</i>	<i>Coracias benghalensis indicus</i>	<i>Nitycorax nitycorax</i>	<i>Yuhina brunneiceps</i>
<i>Amazona pretrei</i>	<i>Corvus albus</i>	<i>Nucifraga caryocatactes</i>	<i>Zosterops japonicus</i>
<i>Amazona rhodocorytha</i>	<i>Corvus corax</i>	<i>Numida meleagris</i>	
<i>Amazona ventralis</i>	<i>Corvus hawaiiensis</i>	<i>Otus lettia</i>	
<i>Amazona vinacea</i>	<i>Corythaeola cristata</i>	<i>Paradisaea raggiana augustaev</i>	
<i>Amazona viridigenalis</i>	<i>Coscoroba coscoroba</i>	<i>Passer montanus</i>	
<i>Amazona xanthops</i>	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Pavo cristatus</i>	
<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Cygnus melanocoryphus</i>	<i>Phasianus colchicus</i>	
<i>Anthropoide sparadiseus</i>	<i>Cygnus olor</i>	<i>Phigys solitarius</i>	
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	<i>Dendrocitta formosae</i>	<i>Pica pica</i>	
<i>Apus niapalensis</i>	<i>Dendrocygna viduata</i>	<i>Pitta nympha</i>	
<i>Ara ararauna</i>	<i>Dicrurus Macrocerus</i>	<i>Porphyrio porphyrio</i>	
<i>Ara ararouca</i>	<i>Ducula forsteni</i>	<i>Psittacula cyanocephala</i>	
<i>Ara cyanoptera</i>	<i>Ecletus roratus roratus</i>	<i>Psittacula derbiana</i>	
<i>Ara ambigua</i>	<i>Eos bornea</i>	<i>Psittacula eupatria</i>	
<i>Ara couloni</i>	<i>Eos semilarvata</i>	<i>Psittacula himalayana</i>	
<i>Ara hyacinthinus</i>	<i>Eurypyga helias major</i>	<i>Psittacula krameri</i>	
<i>Ara macao</i>	<i>Eunymphicus cornutus</i>	<i>Psittacula longicauda</i>	
<i>Ara maracana</i>	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Psittacula roseata</i>	
<i>Ara militaris</i>	<i>Falco vespertinus</i>	<i>Psittaculirostris edwardsii</i>	
<i>Ara nobilis</i>	<i>Gallirallus owstoni</i>	<i>Psitteuteles goldiei</i>	

Componentes do Sexagem aves Box 1.0 Typing Kit

- **Mistura de reacção Sexagem**

1 tubo **SexAves mix** – 700 µl (conservar de -30 a -15°C)

- **Controlo Positivo Fêmeas CF**

1 tubo **CF** - 50 µl (conservar de -30 a -15 °C)

- **Controlo Positivo Machos CM**

1 tubo **CM** - 50 µl (conservar de -30 a -15°C)

- **Manual de instruções**

1 Manual de Instruções

Componentes da PCR Master Mix

Nucleótidos:

concentração final de cada dNTP é 600 µM

Tampão da PCR:

concentrações finais são 3,3x NH₄, 2,0 mM MgCl₂ e 0,4 u/µl
Amplitaq DNA polimerase, pH 8.3.

Glicerol:

concentração final é 16,6%

Vermelho de cresol:

concentração final é de 300µg/ml

Aviso de garantia

geneBOX –investigação e desenvolvimento de teste diagnósticos responsabiliza-se, perante os seus clientes, pelos defeitos no material e componentes dos seus produtos aplicados em condições normais. Os produtos da empresa que apresentam esta garantia devem ser substituídos, sem encargos para o cliente.

Esta garantia aplica-se só para produtos que sejam manipulados e armazenados de acordo com as especificações e recomendações de utilização.

As reclamações devem ser enviadas, por escrito, directamente para a geneBOX e devem ser acompanhadas por uma cópia da guia de transporte ou factura do produto.

Este produto não pode ser reformulado, reembalado ou revendido em nenhuma forma sem o exposto 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 Sexagem aves Box apresentam as especificidades dadas nas folhas e tabelas de interpretação de resultados do produto.

1. 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.

A 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.

2. Controlos Positivos

Armazenamentos a -20°C, os controlos positivos permanecem estáveis durante 18 meses a partir da data de produção (ver validade do lote na embalagem).

Armazenamentos a 4°C, os controlos positivos permanecem estáveis durante 15 dias a partir da data de recepção.

A temperatura ambiente, os controlos positivos permanecem estáveis durante 3 dias a partir da data de recepção.

Os controlos positivos nunca devem ser deixados ou armazenados com as tampas abertas.

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).

Protocolo de amplificação por PCR

Reagentes

- Amostra de DNA (100-200 ng/μl)
- Mistura de reacção **SexAves mix**
- Controlo positivo Fêmeas **CF***
- Controlo positivo Machos **CM***
- Água bi-destilada estéril (não fornecida)

* Estes componentes apresentam alto potencial contaminante, dado conter DNA machos e fêmeas, recomenda-se o máximo cuidado no seu manuseamento.

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 50ng – 200 ng/μl.

Alternativamente, o DNA pode ser extraído utilizando sais de Brometo de Trimetilamonia (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. Para cada detecção pipete de acordo com a tabela II.
3. Para os controlo positivo fêmeas proceder como em (2), substituindo o DNA de amostra por 2 μl **Tubo** Controlo Positivo Fêmeas **CF**,
4. Para os controlo positivo Machos proceder como em (3), substituindo **CF** por 2 μl **Tubo** Controlo Positivo Machos **CM**,

Tabela II – Componentes da reacção de PCR

Componente	1 Reacção
Tubo SexAves mix	7 µl
DNA de amostra	2 µl
Água bi-destilada estéril	1 µl
Volume final	10 µl

- Coloque os componentes da reacção no termociclador e corra o seguinte programa de PCR.
- Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 4%.
- Use a Tabela de interpretação de resultados para interpretar os resultados.

NOTA: Por cada utilização do kit deve correr, pelo menos, uma reacção do CF e uma do CM.

Parâmetros do programa PCR

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	96 °C	1 min	1
Desnaturação	96 °C	45 seg	35
Emparelhamento	55°C	1 min	
Extensão	72 °C	1 min	
Extensão	72 °C	10 min	1
Guardar (opcional)	4 °C	Infinito	1

- No final da PCR guarde a reacção a 2-8 °C.
- Detecte os produtos do PCR com uma electroforese em gel de agarose a 5%.

Guia Técnico

1. Pureza e Concentração do DNA

Para obter bons resultados com o Sexagem aves 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 Sexagem aves 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 Sexagem aves Box 1.0 Typing Kit™ é obrigatória a utilização da PCR Master Mix fornecida com o Kit

4. Procedimentos de amplificação

No fim da PCR, examine o grau de evaporação e de condensação da mistura de reacção da PCR. Se as perdas de volume forem superiores a 20% não devem ser validados os resultados obtidos. De forma a prevenir esta situação devem adicionar previamente óleo mineral à mistura de reacção ou utilizar um adaptador de silicone para placas de 96. Também se deve ter em atenção a temperatura de aquecimento do aparelho. Se a temperatura de aquecimento não for suficiente vão se verificar problemas de condensação.

5. Termociclador

Recomenda-se utilização de qualquer Termociclador que apresente as seguintes características:

- "heating rate" superior a 2.5°C/sec; "cooling rate" superior a 1.5°C/sec; gama de temperaturas 4-100°C; uniformidade de temperaturas ±0.5°C; "heated lid" superior a 100°C.

6. Validade

Como especificado na embalagem

Se os problemas persistirem, por favor contactem com o apoio técnico para o +351 231 410 946

Avisos e precauções

A amplificação por PCR permite-nos obter milhões de cópias de DNA a partir de uma pequena quantidade de amostra. Infelizmente isto também é verdade para o DNA contaminante, que pode comprometer performance da nossa reacção. Consequentemente, práticas laboratoriais específicas podem evitar a presença de amplificações inespecíficas. Em baixo encontram-se descritas as recomendações da Genebox:

- Separe fisicamente as áreas de pré-PCR e de pós-PCR.
- O fluxo Laboratorial deve ser sempre unidireccional da área pré-PCR para a área pós-PCR.
- Deve sempre utilizar-se equipamentos específicos para cada area de trabalho (preparação de amostras; pré-amplificação amplificação e pós-amplificação).
- Todos os equipamentos utilizados na área de pós-PCR não devem 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.

Protocolo de electroforese em gel de agarose

Preparação do gel de agarose a 4%

1. Dissolver **10 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 tira 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. Nas extremidades das filas do gel adicione **10 ul de** marcador de peso molecular (opcional).
4. Adicione **10 µl** do **produto de PCR** nos restantes poços.
5. Ligue a tina de electroforese à corrente com uma voltagem média (**115V**).
6. Deixe a electroforese correr por cerca de 40 minutos, ou até o corante estar a 2/3 da linha.
7. Ponha o gel no transiluminador.
8. Fotografe o gel e identifique-o.
9. Use a **Tabela de interpretação de resultados** para interpretar os resultados.

Tabela de Interpretação de resultados

Tabela III – Interpretação de Resultados válidos

Poço	Cromossoma Z (220pb a 620pb)**	Cromossoma W (240pb a 640pb)**	Interpretação	Validação
Amostra	+	+	Fêmea	Validado
Amostra	+	-	Macho	
CF	+	+	Controlo positivo Fêmea	
CM	+	-	Controlo positivo Macho	

Tabela IV – Interpretação de Resultados não válidos

Poço	Cromossoma Z (220pb a 620pb)**	Cromossoma W (240pb a 640pb)**	Interpretação	Validação
Amostra	-	-	indeterminado	Repetir a reacção
CF	-	+	indeterminado	
CF	+	-	indeterminado	
CM	-	-	indeterminado	

** O Tamanho da banda específica varia, até 400 pares de bases, consoante a espécie analisada. ^{1, 2 e 3}

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
		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 Mude de luvas frequentemente Repita a tipagem com um DNA de boa qualidade	
	Degradação da amostra de DNA	
		Amostra de DNA muito concentrada
Problemas com tampão de electroforese: Fora de prazo ou composição errada	Use um tampão recomendado novo	