

INSTRUÇÕES DE USO

FAMÍLIA SECORE

KIT DE SEQUENCIAMENTO SECORE®

1. USO PRETENDIDO

Identificação de alelos HLA de Classe I e Classe II.

*PRODUTO PARA USO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

2. INTRODUÇÃO

A tipagem HLA é de grande interesse na Medicina, pois está relacionada à susceptibilidade a doenças, bem como ao processo de rejeição em transplantes de tecidos e órgãos sólidos. Os Antígenos leucocitários humanos (HLA) eram anteriormente determinados pelo teste de linfocitotoxicidade. Entretanto, com o advento das tecnologias da PCR, técnicas de tipagem baseadas em DNA tornaram-se rotina nos laboratórios. Para a grande maioria das metodologias baseadas em DNA, o processo da PCR é utilizado somente como um passo de amplificação para obter o DNA alvo necessário. Normalmente, o processo de tipagem HLA requer um passo pós-amplificação para discriminar entre os diferentes alelos (ex.: RFLP, SSOP, DOT BLOT reverso, SBT).

Os kits Secore SBT usam o método de sequenciamento Sanger para efetuar o sequenciamento de alelos HLA de classe I e II (A, B, C, DRB1, DRB3, 4, 5, DQB1 e DPB1) oriundos de DNA genômico. Kits de sequenciamento de alta resolução, locus específico, fornecem reagentes para amplificação, purificação e sequenciamento de alelos HLA. Os fragmentos de sequenciamento desnaturados são processados por eletroforese capilar em um analisador genético. Arquivos output gerados pelo analisador são importados em software para análise da sequência HLA, o qual analisa os dados de output contra dados do banco de dados IMGT/HLA para determinar a tipagem molecular.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

Os kits de sequenciamento SeCore® identificam diretamente as seqüências de DNA dos genes HLA alvos. A amplificação locus-específica do DNA genômico é obtida através de reação deste com um mix de amplificação e Taq DNA polimerase FastStart™. O produto resultante é tratado com ExoSAP-IT™ para degradar primers não incorporados e nucleotídeos livres. A seqüência nucleotídica e o subtipo HLA resultante são determinados pelo método BigDye®, um tipo de sequenciamento baseado em nucleotídeos terminadores com diferentes fluorescências. As reações finais são purificadas por precipitação com etanol, e as amostras desnaturadas são então carregadas no sequenciador automatizado Applied Biosystems Incorporated ABI, onde são detectados os resultados.

Em outras palavras, os kits Secore de tipagem HLA oferecem sequenciamento bidirecional de alelos HLA de classe I e de classe II.



1. Amplificação PCR HLA locus específica é realizada em tempo estabelecido pelo protocolo usando solução master mix contendo mistura de amplificação, FastStart™ Taq Polimerase e amostra de DNA genômico. A cobertura de exons está de acordo com o locus a ser amplificado.

2. O produto amplificado é limpo pelo uso de ExoSAP-IT® para eliminar primers e dNTPs não incorporados.

3. Ciclo de sequenciamento após decorrido tempo estabelecido usando BigDye Terminator do kit de Ciclo de Sequenciamento.

4. Fragmentos sequenciados são purificados (precipitação/etanol)e desnaturados usando Hi-Di™.

5. Produto desnaturado é detectado por eletroforese capilar em um analisador genético.

6. Os resultados são retirados do analisador genético na forma de arquivos .ab1: software de análise de sequências HLA é usado para analisar os arquivos output contra dados do banco de dados IMGT/HLA para determinar a tipagem HLA.

4. COMPONENTES

CLASSE I	COMPONENTES	QUANTIDADE
Locus A	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	6 frascos (Exon 2 Fwd/Rev Exon 3 Fwd/Rev Exon 4 Fwd/Rev)
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco
Locus B (Single Amplification)	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	6 frascos (Exon 2 Fwd/Rev Exon 3 Fwd/Rev Exon 4 Fwd/Rev)
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco
Locus C	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	6 frascos (Exon 2 Fwd/Rev Exon 3 Fwd/Rev Exon 4 Fwd/Rev)
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco

CLASSE II	COMPONENTES	QUANTIDADE
Locus DPB1	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco Exon 2 1 frasco Exon 3
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	8 frascos (Exon 2 Fwd/Rev Exon 3 Fwd/Rev Exon 4 Fwd/Rev Codon 8, Codon 85)
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco
Locus DQB1	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco Exon 2 1 frasco Exon 3
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	4 frascos (Exon 2 Fwd/Rev Exon 3 Fwd/Rev)

	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco
Locus DRB1*	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	3 frascos (Exon 2 Fwd/Rev TG Codon 86 Rev)
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco
Locus DRB1 Exon 2 e 3 kit de sequenciamento	Amp Mix (primers locus específicos)	1 frasco Exon 2 1 frasco Exon 3
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	5 frascos (Exon 2 Fwd/Rev Exon 3 Fwd/Rev TG Codon 86 Rev)
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco
DRB Group (Locus DRB1, DRB3, 4 e 5)	Amp Mix (primers locus específicos)	11 frascos**
	Fast Start Taq DNA Polimerase (5U/μl)	1 frasco
	ExoSAP-IT	1 frasco
	Seq Mix (primers, terminadores e enzima de sequenciamento)	2 frascos Exon 2 Fwd/Rev 1 frasco TG Codon 86 Rev
	Tampão de precipitação (PPT Buffer)	1 frasco

* O locus DRB1 será identificado como KIT de Amplificação Locus DRB1 (Single) ao longo deste documento.

**Os 11 Grupos DRB inclusos nas Amp mix são:

DRB1*01, DRB1*03/11/13/14, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08/12, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*15/16, DRB3, DRB4, DRB5.

Os volumes estão descritos na rotulagem de cada frasco.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Todos os componentes devem ser armazenados a uma temperatura de -20°C, em freezer não *frost-free*. Após aberto, o produto também deve ser mantido em freezer.

As Seq Mix listadas acima são fotossensíveis e devem ser protegidas da luz no armazenamento e no momento do uso.

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- 6.1. Termociclador 96-poços com tampa aquecida;
- 6.2. Sequenciador de DNA automatizado e acessórios;
- 6.3. Os kits SeCore® foram testados nos seguintes sequenciadores: Applied Biosystems ABI Prism® 3100, 3730 e 3500xL. O uso de diferentes sequenciadores requer validação pelo usuário.
- 6.4. Reagentes e acessórios que foram testados com os kits SeCore®:

Equipamento	Nome do Produto	Cód. Produto Applied Biosystems
ABI 3100 Genetic Analyzer (PN 3100-01)	36 cm, 3100 Capillary Array	4315931
	POP-6™ Polymer	4316357
	310 Running Buffer, 10X	402824
	Matrix Standards Kit, BigDye® Terminator v1.1	4336824
	Hi-Di™ Formamide	4311320
ABI 3730 DNA Analyzer (PN 3730S)	36 cm, 3730 Capillary Array	4331247
	POP-6™ Polymer	4316357
	POP-7™ Polymer	4363929
	3730 Running Buffer, 10X	4335613
	Sequencing Standards, BigDye® Terminator v1.1	4336799
	Hi-Di™ Formamide	4311320
ABI 3500xL Genetic Analyzer (PN 4440463)	50 cm, 3500xL Capillary Array	4404689
	POP-6™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393717
	POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers	4393708
	Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series	4393927
	Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series	4408256
	Sequencing Install Standard, BigDye® Terminator v1.1	4404314
	Sequencing Install Standard, BigDye® Terminator v3.1	4404312
	Hi-Di™ Formamide	4440753

- 6.5. Conjunto MicroAmp® 96-well Tray/Retainer, código de produto Applied Biosystems 403081;
- 6.6. Tubos de reação MicroAmp® 0.2-ml, Tubos de Reação (8 tubos/strip) e Tampas (8 tampas/strip), código de produto Applied Biosystems N801-0533, N801-0580 e N801-0535 (ou similar);
- 6.7. Placa de Reação MicroAmp® Optical 96-Well e 9600 Full Plate Cover, código de produto Applied Biosystems N801-0560 e N801-0550 (ou similar);

- 6.8. Centrífuga de bancada com adaptadores para placa de 96 poços. A centrífuga deve atingir uma força de 2500 x g;
- 6.9. Micropipetas e Ponteiras: 1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl;
- 6.10. Micropipetas de dispensação Eletrônica: capacidade de dispensação de alíquotas entre 1-125 µl;
- 6.11. Micropipetas Multicanais (8 ou 12 canais): Volume ajustável entre 1-100 µl;
- 6.12. Sistema de eletroforese em gel de agarose;
- 6.13. Sistema de resfriamento para microtubos 0.2 ml,;
- 6.14. Tampão TE (10mM Tris, pH 8.3, 0.1mM EDTA);
- 6.15. Etanol Absoluto;
- 6.16. Agarose grau Biologia Molecular;
- 6.17. Brometo de Etídeo;
- 6.18. Marcador de Peso Molecular 300 – 1300pb;
- 6.19. Software de Sequenciamento: (acompanha os sequenciadores)
Para uso com ABI 3100 e 3730:
 - ABI Prism® Data Collection Software v1.1 or higher (Win NT)
 - Sequencing Analysis Software v3.7 or higher (Win NT)Para uso com ABI 3500xL:
 - 3500xL Data Collection Software v1.0 (Windows® Vista SP1)
- 6.20. Software de análise HLA:
 - Software Fusion® ou uTYPE® SBT

7. PRECAUÇÕES E AVISOS

Estão descritos ao longo deste documento ver NOTA ou IMPORTANTE.

8. AMOSTRAS

DNA purificado com DO260/280 entre 1.7 e 1.9.

NOTA: As amostras de sangue devem ser coletadas em tubos com anticoagulante ACD ou EDTA. Não utilizar tubos com heparina.

IMPORTANTE: A performance da extração de DNA varia de acordo com o kit de extração utilizado. O fenol, etanol e SDS podem causar inibição da reação de PCR.

Para preparar uma solução de trabalho do DNA purificado com 15-30 ng/µl, diluir o DNA em TE. Para armazenamento por longo prazo, a diluição neste tampão é recomendada. Para uso imediato, o DNA também pode ser diluído em água ultrapura, mas deve ser descartado após o uso.

NOTA: Para evitar a contaminação cruzada, trocar as ponteiras entre as pipetagens de cada amostra de DNA e a cada troca de mix ou reagente. A mesma ponteira pode ser utilizada para dispensar um mesmo mix ou reagente em múltiplos tubos, desde que não haja contato com DNA genômico ou produto de PCR. Caso haja qualquer dúvida de que isso possa ter ocorrido, trocar a ponteira para prevenir a contaminação.

9. PREPARO DOS COMPONENTES

Todos os componentes já estão prontos para o uso.

10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS UTILIZADAS EM CONJUNTO COM O PRODUTO

Verificar a Seção 6 – MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS.

11. PROTOCOLO

11.1. Amplificação de Locus Específico do DNA genômico:

O Amp Mix dos kits SeCore® não contém a enzima Taq DNA Polimerase. Para preparar a master mix para amplificação de DNA genômico, adicionar o Amp Mix e o FastStart™ Taq DNA Polimerase em um tubo limpo, homogeneizar no agitador tipo vortex e centrifugar brevemente para que o conteúdo fique no fundo do tubo.

NOTA: É recomendado que a master mix contenha um mínimo de 5 reações, para garantir a acurácia da pipetagem dos pequenos volumes de enzima.

IMPORTANTE: Devido à natureza viscosa da FastStart™ Taq DNA Polimerase, cuidados devem ser tomados para remover o excesso de Taq remanescente por fora da ponteira antes da dispensação da enzima na máster mix. A Taq deve ser pipetada a partir da borda do frasco, e o usuário deve evitar submergir a ponteira na enzima. A falha na remoção do excesso de Taq resultará em falta de enzima para futuras reações.

11.2. Preparo de Reação de Amplificação Classe I

11.2.1. Os kits de Locus A, B, e C contém um frasco de Amp Mix. Para cada grupo de amostras a ser amplificado, preparar uma reação por amostra e mais uma para o controle negativo.

11.2.2. Para cada reação de amplificação, adicionar 19,8 µl de Amp Mix e 0,2 µl de FastStart™ Taq DNA Polimerase. Homogeneizar no agitador tipo vortex. Para preparar o master mix para múltiplas reações, utilizar a tabela abaixo como exemplo para calcular o volume. Preparar o volume total de master mix com uma reação adicional, devido à perda de volume durante a pipetagem.

Classe I	n = Número de amostras	
	n=5	n=20
Amp Mix 19,8 µl por reação	99 µl	396 µl
FastStart™ Taq 0,2 µl por reação	1.0 µl	4.0 µl

11.2.3. Adicionar 5 µl de cada amostra de DNA (15-30 ng/µl) a um tubo de reação. Adicionar 5 µl de água ultrapura ao controle negativo.

11.2.4. Adicionar 20 µl do master mix em cada tubo.

11.2.5. Fechar os tubos e centrifugar brevemente.

11.2.6. Levar os tubos a um termociclador. Iniciar a PCR de acordo com o protocolo descrito no item 11.4.

NOTA: Os itens 11.2.4 a 11.2.6 devem ser realizados de maneira otimizada, de modo a reduzir o tempo entre a mistura da amostra com a master mix e o início da ciclagem térmica.

11.3. Preparo de Reação de Amplificação Classe II

11.3.1. O kit Locus DRB1 (*Single*) contém uma Amp Mix. Preparar uma reação por amostra mais um controle negativo.

11.3.2. O kit Locus DRB1 Exon 2 e 3 consiste em duas Amp Mix. Para cada grupo de amostras a ser amplificado, preparar duas reações por amostra mais um controle negativo.

11.3.3. O kit DRB *Group* contém 11 conjuntos de Amp Mix. É designado para amplificar separadamente os grupos DRB1/3/4/5 e obter uma melhor resolução, além de facilitar a análise. Para amostras de tipagem desconhecida, as 11 reações de amplificação devem ser realizadas. Preparar 11 reações por amostra, mais um controle negativo para cada conjunto de Amp Mix.

NOTA: Quando a tipagem HLA de baixa resolução da amostra é conhecida, o usuário pode escolher os grupos necessários a serem amplificados para uma melhor resolução do sequenciamento DRB1.

11.3.4. Os kits DPB1 contém 2 frascos de Amp Mix. Ambas as reações de amplificação devem ser feitas para amostras de tipagem desconhecidas. Prepare um controle negativo para cada conjunto de Amp Mix.

11.3.5. Os kits DQB1 contém 2 conjuntos de Amp mix. Ambas as reações de amplificação devem ser feitas para cada amostra. Prepare duas reações por amostra. Preparar um controle negativo para cada conjunto de Amp mix.

11.3.6. Para cada reação de amplificação, adicionar 22,8 µl de Amp Mix e 0,2 µl de FastStart™ Taq DNA Polimerase. Homogeneizar em agitador tipo vortex. Para preparar a master mix para múltiplas reações, utilizar a tabela abaixo como exemplo para calcular os volumes.

Classe II	n = Número de amostras	
	n=5	n=20
Amp Mix 22,8 µl por reação	114 µl	456 µl
FastStart™ Taq 0,2 µl por reação	1.0 µl	4.0 µl

11.3.7. Adicionar 2 µl de cada amostra de (15-30 ng/µl) a um tubo de reação ou microplaca. Adicionar 2 µl de água ultrapura para a reação de controle negativo.

11.3.8. Adicionar 23 µl do master mix a cada tubo.

11.3.9. Fechar os tubos e centrifugar brevemente.

11.3.10. Levar os tubos a um termociclador. Iniciar a PCR de acordo com o protocolo descrito no item 11.4.

NOTA: Os itens 11.3.8 a 11.3.10 devem ser realizados de maneira otimizada, de modo a reduzir o tempo entre a mistura da amostra com o master mix e o início da ciclagem térmica.

11.4. Protocolo para Ciclagem da Amplificação do DNA genômico:

NOTA: O Protocolo de ciclagem da amplificação é idêntico para Classe I e Classe II.

Passo	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
<i>Soak</i>	1	95°C	4 min
<i>Cycle</i>	35	95°C	20 seg
		63°C	20 seg
		72°C	40 seg
<i>Extension</i>	1	72°C	5 min
<i>Soak</i>	1	4°C	Infinito*

O tempo total de PCR é de aproximadamente 1,5h.

*Remover na hora de passar para a próxima etapa.

NOTA: Se os itens 11.5 e 11.6 não forem realizados imediatamente, os produtos de PCR podem ser armazenados a 4°C. Entretanto, a Purificação dos Amplicons (ExoSAP-IT™) deve ser feita em até 18 horas.

11.5. Eletroforese em gel de agarose:

11.5.1. Confirmar a presença de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose (2.0%). Aplicar no gel 5 µl de produto amplificado mais um corante para corrida. Proceder à eletroforese de acordo com o protocolo do laboratório. Correr o gel por tempo suficiente para visualizar a separação das bandas específicas de Classe I e Grupos DR. O tamanho correto dos amplicons deve ser maior do que 35ng por banda ao aplicar 5 µl por poço. Ao serem coradas com brometo de etídeo (250 ng/ml Agarose) e visualizadas sob luz UV, as bandas devem possuir intensidade equivalente ou superior quando comparada a qualquer banda do marcador de peso molecular recomendado exceto a banda mais intensa de 500bp.

11.5.2. Produtos esperados para cada amplificação locus específica:

Kit	Tamanho aproximado do Produto (pb)	Controle interno aprox. (pb)
Locus A	~1100 e ~990	Nenhum
Locus B (Single)	~1400 e ~950	Nenhum
Locus C	~1375	Nenhum
Kit de Amplificação Locus DRB1 (Single)	~300	Nenhum
Locus DRB1 Exon 2 e 3 Kit de Sequenciamento	Exon 2: ~500-850 Exon 3: ~450	Nenhum
DRB <i>Group</i>	~300	~600
Locus DQB1	~350 e ~375	Nenhum
Locus DPB1	~300 e ~1000	Nenhum

Este símbolo ~ significa aproximadamente.

NOTA: Uma banda fraca maior que 300pb pode ser visualizada para alguns produtos de amplificação do kit Locus DRB1 (Single). O resultado do sequenciamento não é afetado pela presença desta banda.

11.5.3. Para confirmação se todos os grupos do kit DRB *Group* foram amplificados, todas as reações devem ser checadas em gel de agarose. Só devem ser realizadas reações de sequenciamento para amostras com bandas positivas de 300pb.

11.6. Purificação dos Amplicons da PCR (ExoSAP-IT™):

11.6.1. O tratamento dos amplicons com ExoSAP-IT™ irá degradar primers não incorporados e dNTPs hidrolisados.

IMPORTANTE: Siga as orientações de Taq listadas no item 11.1 para a pipetagem de enzimas viscosas quando adicionar a ExoSAP-IT™.

11.6.2. Se você não realizar a eletroforese em gel (ver Item 11.5. Eletroforese em gel de agarose) remova e descarte 5 µl de cada produto de DNA amplificado.

11.6.3. Adicionar 4 µl de ExoSAP-IT™ aos tubos de amplificação:

11.6.3.1. Para o kit DRB *Group* adicionar ExoSAP-IT™ apenas aos tubos com bandas positivas de 300pb.

11.6.4. Fechar os tubos e centrifugar por ~ 5 segundos para trazer o conteúdo para o fundo do poço.

11.6.5. Misturar no agitador tipo vortex vigorosamente (~10 segundos).

NOTA: Certifique-se de que o ExoSAP-IT™ foi bem homogeneizado com os produtos de PCR. Isto é essencial para o sucesso da purificação.

11.6.6. Centrifugar brevemente para trazer o conteúdo ao fundo do tubo ou poço.

11.6.7. Levar ao termociclador e correr o seguinte protocolo:

Passo	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
Cycle	1	37°C	20 min
		80°C	20 min
Soak	1	4°C	Infinito

NOTA: Amplicons tratados com o ExoSap-IT™ podem ser armazenados a -20°C por até duas semanas.

11.7. Reação de Sequenciamento:

Reações de Sequenciamento para cada locus:

Locus A, B, C	KIT de Amplificação Locus DRB1(single)	Kit de sequenciamento Locus DRB1 Exon 2 e 3	DRB Group	Locus DQB1	Locus DPB1
Exon2 Foward Exon2 Reverse Exon3 Foward Exon3 Reverse Exon4 Foward Exon4 Reverse	Exon2 Foward Exon2 Reverse Codon 86 Reverse	Exon2 Forward Exon2 Reverse Exon3 Forward Exon3 Reverse Codon 86 Reverse	Exon2 Foward Exon2 Reverse Codon 86 Reverse	Exon2 Foward Exon2 Reverse Exon3 Foward Exon3 Reverse	Exon2 Foward Exon2 Reverse Exon3 Foward Exon3 Reverse Exon4 Foward Exon4 Reverse Codon 8 Forward Codon 85 Reverse

11.7.1. Para cada reação específica positiva de DRB *Group*, preparar 2 reações de sequenciamento. O número mínimo de reações de sequenciamento é 2, quando uma amostra tiver apenas uma amplificação positiva. O número máximo de reações de sequenciamento é 8, quando a amostra tiver duas ampliações positivas de locus DRB1 e duas ampliações positivas de locus DRB3/4/5. O preparo da reação de códon 86 é opcional (ver item 12).

11.7.2. É muito importante verificar se o mix de sequenciamento e o amplicon tratado estão sendo dispensados no tubo correto.

Para o kit Locus DQB1, preparar reações de sequenciamento *forward* e *reverse* para as reações positivas de exons 2 e 3. O mix de sequenciamento Exon 2 deve ser usado com o amplicon exon 2, bem como o mix do exon 3 com o amplicon do exon 3, resultando em um total de 4 reações por amostra.

Para o kit DPB1 2 Amp preparar reações de sequenciamento *forward* e *reverse* para os exons 2-4. O mix de sequenciamento exon 2 deve ser usado com o amplicon exon 2, os mixes exon 3 e 4 devem ser usados com os amplicons exon 3 e 4.

Para o kit de sequenciamento DRB1 exon 2 e 3 preparar reações de sequenciamento *forward* e *reverse* para os exons 2 e 3. O mix de sequenciamento Exon 2 deve ser usado com o amplicon exon 2, bem como o mix do exon 3 com o amplicon do exon 3. Para a reação de sequenciamento do códon 86 ver item 11.8.

11.7.3. O layout de amostras dependerá da configuração do instrumento de análise, isto é, o número de capilares. Verificar as instruções do software de análise uTYPE® para recomendações sobre como nomear as amostras. Como opção, poderá ser usada uma planilha excell para montagem da placa.

Para instrumentos com 16 capilares, o seguinte layout da placa Optical 96 é sugerido:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1F	S1R										
B	S2F	S2R										
C												
D												
E												
F												
G												
H	▼	▼	▼	▼								

NOTA: S1F e S2F correspondem à reação *forward* das amostras 1 e 2, enquanto S1R e S2R correspondem à reação *reverse* das amostras 1 e 2.

11.8. Sequenciamento SeCore® DR Códon 86

Resultados de ambiguidade da tipagem DRB1

Se os resultados de tipagem de DRB1 forem ambíguos, os nucleotídeos associados ao Códon 86 devem ser analisados. Duas posições consecutivas com a sequência KK (K=G/T) indicam ambiguidade relacionada ao Códon 86. Elas podem aparecer quando usado o kit de sequenciamento do Locus DRB1 (*Single*), kit de sequenciamento Locus DRB1 Exon 2 e 3 ou amplicons para o kit de sequenciamento DRB *Group*:

Para resolver a ambiguidade prepare uma nova reação de sequenciamento usando o Códon TG 86 Ver Seq Mix.

Genes do grupo DRB1

Os genes DRB1 podem ser divididos em dois grupos, com base na sequência do Códon 86:

O grupo com a sequência GTG e o outro grupo possui GGT nessa posição.

O uso do primer de sequenciamento, alvo específico GTG (TG Códon 86 Rev Seq Mix), permite o sequenciamento separado de um dos dois alelos da amostra, para resolver ambiguidades associadas ao Códon 86. O resultado será a sequência anti-sense de um alelo do par alélico da amostra. O sequenciamento do Códon 86 de DR pode ser feito junto ou depois do sequenciamento do Locus DR.

Procedimento para sequenciamento do Códon 86

11.8.1. Preparar uma reação de sequenciamento usando os amplicons tratados com ExoSAP-IT™ do kit de amplificação Locus DRB1 (*Single*), kit de sequenciamento locus DRB1 exon 2 e 3 e kit de sequenciamento DRB *Group*. Veja o preparo da reação de sequenciamento no item 11.10.

11.8.2. Executar o procedimento de precipitação com etanol dos produtos da reação de sequenciamento conforme item 11.12 capilar e eletroforese dos produtos da reação de sequenciamento no Sequenciador Capilar conforme item 11.13.

11.8.3. Os dados devem ser analisados juntamente com os dados provenientes do kit de amplificação locus DRB1 (*Single*), locus DRB1 exon 2 e 3 ou kit DRB *Group*.

11.9. Sequenciamento SeCore® DPB1 Códons 8 e 85

Resultados de ambiguidade da tipagem DPB1

Se os resultados de tipagem do DPB1 forem ambíguos, sequências dos Códons 8 e 85 devem ser analisadas.

Os resultados de ambiguidades podem ser distinguidos usando a sequência de nucleotídeo do Códon 8, Códon 85 ou usando ambos os códons.

Usar o primer de sequenciamento Códon 8 CTT forward (Z39) e primer de sequenciamento Códon 85 GAG reverse (Z38) para identificar a localização destas sequências.

Os amplicons tratados com ExoSAP-IT™ do kit de sequenciamento do Locus DPB1 são usados para a reação de sequenciamento. O sequenciamento do Códon 8 e Códon 85 de DP pode ser feito junto ou depois do sequenciamento do Locus DP.

Procedimento para sequenciamento do Códon 8 e Códon 85

11.9.1. Prepare a reação de sequenciamento usando o ExoSAP-IT™ tratado com o amplicon exon 2. Veja o preparo das reações sequenciamento no item 11.10.

11.9.2. Executar os procedimentos da precipitação com etanol dos produtos da reação de sequenciamento conforme item 11.12 e eletroforese dos produtos da reação de sequenciamento no Sequenciador Capilar conforme item 11.13.

11.9.3. Os dados devem ser analisados juntamente com os dados provenientes do kit de sequenciamento SeCore® do Locus DPB1.

11.10. Preparo das reações de sequenciamento:

NOTA: As misturas das reações de sequenciamento devem ser mantidas na temperatura mais baixa possível, ou pelo uso de um sistema de resfriamento para microtubos pelo uso de gelo.

11.10.1. Para reações de Classe II apenas, adicionar 40 µl de água ultrapura aos amplicons tratados com ExoSAP-IT™ e homogeneizar.

11.10.2. Para reações Classe I e Classe II, adicionar 2 µl de amplicon tratados com ExoSAP-IT™ (ou amplicon de Classe II diluídos conforme passo 11.10.1) no tubo ou poço apropriado.

- 11.10.3. Adicionar 8 µl de cada Seq Mix específica ao tubo ou poço apropriado.
- 11.10.4. Fechar os tubos ou placas, homogeneizar no agitador tipo vortex e centrifugar brevemente.
- 11.10.5. Levar ao termociclador e correr o protocolo descrito no item 11.11.

11.11. Protocolo Sequenciamento:

- 11.11.1. Inicie a corrida. Quando o termociclador atingir temperatura superior a 80°C, coloque os tubos ou a placa no equipamento e feche a tampa.

NOTA: O protocolo de Sequenciamento é idêntico para reações de sequenciamento Classe I e Classe II.

Passo	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
Cycle	25	95°C	20 seg
		50°C	15 seg
		60°C	60 seg
Soak	1	4°C	Infinito*

O tempo total de PCR é de aproximadamente 1,5h.

*Removido apenas quando passar para a próxima etapa.

NOTA: Proceder com a precipitação com Etanol dos produtos de reação em até 24 horas (ver instruções do item 11.12).

11.12. Precipitação com etanol dos produtos da reação de sequenciamento

Após os ciclos de sequenciamento, uma precipitação com etanol é realizada para remover o excesso dos terminadores. As instruções são idênticas para as reações de sequenciamento de Classe I e Classe II.

- 11.12.1. Adicionar 2 µl de Sequencing PPT Buffer em cada reação.

NOTA: Neste passo é recomendado o uso de pipeta com único canal ou pipeta de repetição. O uso de reservatórios ou pipeta multicanal pode resultar em significativa perda de reagente.

- 11.12.2. Centrifugar brevemente para garantir que todos os componentes estejam misturados e no fundo do poço.

- 11.12.3. Adicionar 40 µl de etanol absoluto (100%) em cada reação.

- 11.12.4. Fechar a placa e homogeneizar em agitador tipo vortex por pelo menos 1 minuto.

NOTA: Certifique-se de que o conteúdo de todos os tubos está sendo agitado vigorosamente.

- 11.12.5. Centrifugar a placa em uma centrífuga, com adaptador próprio para placas, por 30 minutos a 2.000 x g ou superior.

- 11.12.6. Remover selo e inverter sobre papel toalha. Centrifugar brevemente (1 minuto a 500 x g) com a placa invertida para remover o máximo de líquido possível.

- 11.12.7. Adicionar 100 µl de etanol 80% aos pellets. NÃO homogeneizar a placa no agitador tipo vortex.

NOTA: O etanol 80% deve ser preparado no dia do uso.

- 11.12.8. Centrifugar a placa por 5 minutos a 2.000 x g ou superior.

- 11.12.9. Remover o sobrenadante com a placa invertida conforme passo 11.12.6.

11.13. Eletroforese dos produtos da reação de sequenciamento no Sequenciador Capilar:

11.13.1. Preparo das amostras

- 11.13.1.1. Adicionar 15 µl de Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, produto código: 4311320) em cada pellet de DNA.

- 11.13.1.2. Fechar a placa e centrifugar brevemente para que todos os componentes fiquem no fundo dos poços.

- 11.13.1.3. Desnaturar as amostras à 95°C por 2 minutos no termociclador.

- 11.13.1.4. Centrifugar brevemente para remover qualquer bolha que tenha ficado nas amostras.

NOTA: Se bolhas de ar entrarem no capilar, isso irá causar danos neles.

- 11.13.1.5. Colocar a placa no sequenciador.

11.14. Condições de eletroforese sugeridas nos sequenciadores capilares ABI:

Equipamento	Parâmetros	Configurações POP-6	Configurações POP-7
ABI 3100	Run Module	RapidSeq36_POP6	Não disponível
	Injection Time	10 segundos	Não disponível
	Run Time	1800 segundos	Não disponível
ABI 3730	Run Module	StdSeq36	FastSeq50
	Injection Time	5 segundos	5 segundos
	Run Time	1800 segundos	1900 segundos
ABI 3500xL	Run Module	StdSeq50	FastSeq50
	Injection Time	Default	Default
	Run Time	3780 segundos	1400 segundos

NOTA: A primeira vez que os Big Dye® 1.1 Terminators forem usados, o usuário precisa correr os *matrix standards*. Seguir as instruções que vêm na embalagem do BigDye® Terminator Matrix Standard (código do produto: 4336824).

Parâmetros e configurações para outros equipamentos podem requerer otimização.

11.15. Análise de dados

11.15.1. Usar software de análise de sequências para processar dados brutos coletados e criar os arquivos de sequências.

11.15.2. Usar software uTYPE® SBT HLA ou Fusion, para processar e analisar as sequências e criar o relatório de tipagem HLA.

NOTA: É extremamente recomendado que o banco de dados de alelos IMGT mais recente esteja implementado para análise dos dados de sequências.

NOTA: Para os usuários do kit de sequenciamento Locus DRB1 exon 2 e 3, mudanças apropriadas necessitam ser feitas para as configurações da Opção *Exon Trim* dentro do software de análise uTYPE®. No menu *Preferences*, clique na aba *Exon Trim Options* e mude os valores de ajuste do DRB1 exon 2 e 3 de “Default” para “Full Exon”.

12. CONTROLE DE QUALIDADE

Problemas	Possíveis Causas	Soluções
Ausência ou pouca quantidade de produto de PCR	A Taq™ FastStart não foi adicionada ao mix de amplificação ou não foi agitada adequadamente quando adicionada.	Repetir amplificação prestando atenção na adição e agitação da Taq com o mix de amplificação. Usar um tubo de tamanho apropriado para a quantidade de reagentes.
	Falha no termociclador.	Checar o histórico da corrida no aparelho. Realizar manutenção ou reprogramação do termociclador.
	Concentração de DNA não adequada.	Quantificar novamente a amostra de DNA e ajustar para 15 – 30 ng/ul. NOTA: no caso de a concentração da amostra estar abaixo da faixa recomendada e a amplificação ser fraca ou ausente, sequenciar a amostra. Uma sequência ou tipagem aceitáveis podem ser alcançadas.
	DNA degradado ou de baixa qualidade.	Correr o DNA em um gel de agarose 1% para avaliar qualidade. O DNA genômico intacto deve ser maior que 3000pb. Repetir a amplificação utilizando 0,3µl de Taq por teste.
	A visibilidade das bandas do produto no gel de agarose está mascarada pelo corante do tampão de carregamento.	Repetir a eletroforese em gel usando um tampão de carregamento diferente.

Presença extra de produtos de amplificação (com exceção do produto do Locus DRB1).	Programa incorreto usado no termociclador.	Repetir amplificação e confirmar se o programa correto foi utilizado.
	Mix de amplificação, DNA ou área de trabalho contaminada.	Descontaminar a área de trabalho ou reextrair o DNA. Repetir a amplificação.
Excesso de <i>Background</i> (<i>baseline noise</i>).	O ExoSAP-IT™ não foi adicionado aos amplicons antes do sequenciamento.	Adicionar ExoSAP-IT™ ao produto da PCR.
	O ExoSAP-IT™ não foi devidamente misturado com o produto da PCR.	Se certificar de homogeneizar vigorosamente no agitador tipo vortex após a adição do ExoSAP-IT™.
	Força do sinal muito alta.	Ver “Força Excessiva do Sinal” abaixo.
	Matriz de baixa qualidade ou incorreta.	ABI 3100, 3730: Repetir a calibração espectral e reinjetar as amostras.
	Injeção de baixa qualidade (ABI 3100)	Reinjetar as amostras.
	ABI 3100, 3730: Tempo de injeção ajustado muito alto.	ABI 3100, 3730: Reduzir tempo de injeção e reinjetar as amostras. (Amostras de baixa qualidade podem apresentar sinais mais fracos, mas ainda podem ser analisadas e tipadas. Algumas amostras podem apresentar sinal superior a 1500 e não apresentar excesso de <i>background</i> .).
	Pobre reação de sequenciamento devido a erros de pipetagem.	Certificar-se de que tanto o produto de PCR tratado com ExoSAP-IT™ quanto o mix correto de sequenciamento sejam adicionados e combinados.
	Arquivo de mobilidade foi incorretamente selecionado – picos estarão deslocados ou sobrepostos.	Escolher arquivo de mobilidade correto.
	Etanol absoluto foi adicionado em excesso.	Refazer sequenciamento. Verificar se a micropipeta está com o volume correto selecionado.
Sinal fraco.	Evaporação do etanol durante a precipitação.	Preparar novas reações de sequenciamento. Purificar os produtos de sequenciamento longe de fluxo direto de ar (por exemplo, o exaustor de uma centrífuga ou outro equipamento), o que pode causar evaporação do etanol.
	Reações de sequenciamento não foram homogeneizadas adequadamente no agitador tipo vortex após a adição do <i>Sequencing PPT Buffer</i> e etanol.	Repetir as reações de sequenciamento. Homogeneizar vigorosamente no agitador tipo vortex (mínimo 60 segundos) após a adição de etanol. Certificar-se de que todas as reações estão sendo homogeneizadas.
	Tempo de injeção precisa ser aumentado.	Repetir as reações de sequenciamento e aumentar tempo de injeção.
“Blobs” excessivas de corante.	Precipitado presente no PPT Buffer	Agitar em agitador tipo vortex até as partículas se dissolverem e o tampão fica claro/transparente.
	O <i>Sequencing PPT Buffer</i> não foi adicionado às reações de sequenciamento antes da adição de etanol.	Repetir as reações de sequenciamento. Adicionar o <i>Sequencing PPT Buffer</i> antes do etanol.
	Falha nas lavagens das reações de	Repetir as reações de sequenciamento

	sequenciamento com etanol 70-80%.	sem omitir as etapas de lavagem com etanol 70-80%.
	Pobre reação de sequenciamento devido a erros de pipetagem ou fraco produto de amplificação.	Certificar-se de que tanto o produto de PCR tratado com ExoSAP-IT™ quanto o mix correto de sequenciamento sejam adicionados e combinados. No caso de amplificação fraca, confirmar a intensidade do produto de amplificação por meio de uma eletroforese em gel de agarose.
	Falha em remover totalmente o etanol durante a precipitação.	Repetir as reações de sequenciamento. O passo de centrifugação a 500 x g é muito importante para remover todo o etanol remanescente dos tubos de reação.
	Etanol usado nas etapas de lavagem estava muito diluído.	Repetir as reações de sequenciamento e confirmar que o etanol que está sendo usado nas etapas de lavagem é de 70-80%.
Sinal muito forte.	ABI 3100, 3730: Tempo de injeção muito alto.	ABI 3100, 3730: Reduzir o tempo de injeção e reinjetar. Amostras de baixa qualidade podem apresentar sinais mais fracos, mas ainda podem ser analisadas e tipadas. Algumas amostras podem apresentar sinal de 2000-3000 e não apresentar excesso de <i>background</i> .
Sinal fraco em fragmentos pequenos enquanto fragmentos maiores apresentam sinais mais altos	Utilização de etanol 80% que não foi preparado no dia	Preparar o etanol 80% no dia do uso.
Sinal forte em fragmentos menores enquanto fragmentos maiores apresentam sinais mais fracos	Amplificação de fragmentos pequenos em excesso durante a purificação.	Repetir as reações de sequenciamento. Reduzir a quantidade de etanol durante os passos de lavagem para uma concentração mínima de 70%.
Falha nas sequencias aleatórias	Pobre reação de sequenciamento devido a erros de pipetagem	Certificar-se de que tanto o produto de PCR tratado com ExoSAP-IT™ quanto o mix correto de sequenciamento sejam adicionados e combinados.

13. DESEMPENHO, INTERFERENTES E LIMITAÇÕES

13.1. Antes da implementação do kit de sequenciamento de HLA SeCore® em seu laboratório, realizar certificação e controle de qualidade para métodos de tipagem baseados em sequenciamento usando amostras com tipagem molecular conhecida. Tais amostras podem ser obtidas do Workshop Internacional – Painel de Células de Referência ou UCLA – Painel de DNA de Referência.

13.2. Todas as tentativas foram realizadas para validar todos os primers de amplificação usados nos kits de sequenciamento de HLA SeCore® com amostras de DNA tipadas por métodos moleculares. Devido ao acesso limitado a esses materiais de referência, alguns alelos raros podem não ter sido testados com esses kits.

- 13.3. Reações de PCR de DNA genômico podem ser montadas em gelo ou no sistema de resfriamento de microtubo, se desejado.
- 13.4. Alguns alelos do Locus DR são amplificados sob outros grupos do kit de sequenciamento DRB Group.

A lista abaixo pode não estar completa.

Alelos	Amplificados por um Mix de Amplificação de
DRB1*0820	DRB1*03/11/13/14
DRB1*1122 DRB1*1410	DRB1*04
DRB1*1105 DRB1*1317 DRB1*1404 DRB1*1411 DRB1*1415 DRB1*1428 DRB1*1431	DRB1*08/12
DRB1*1130 DRB1*1446	DRB3

- 13.5. O mix de amplificação (Amp Mix) do kit de sequenciamento do Locus DRB1 não amplifica os alelos DRB1*1130 e DRB1*1446. No entanto, esses alelos podem ser amplificados por meio do Amp Mix DRB3 do kit de sequenciamento DRB Group.
- 13.6. Uma banda fraca, maior que a banda de 300pb, pode ser vista em alguns produtos de amplificação do kit do Locus DRB1. O resultado do sequenciamento não é afetado pela presença do doublet.
- 13.7. As possíveis ambiguidades de todos os loci podem ser encontradas em www.ebi.ac.uk/imgt/hla/ambig.html.
- 13.8. Para garantir o melhor desempenho dos kits de sequenciamento HLA SeCore®, usar os produtos com os materiais, reagentes e equipamentos recomendados no item 2 desse documento. Uso de outros materiais precisa ser validado pelo usuário.
- 13.9. O primer de sequenciamento locus A exon4-Reverse contém um mismatch direcionado para a especificidade A*32 e A74* amostras. Adicionalmente este mismatch se aplica ao alelo A*02:65. Amostras contendo esses alelos podem exibir um pobre equilíbrio de pico heterozigoto nos dados de sequenciamento do Exon4-reverse. Os dados de sequenciamento do Exon4-Foward não serão afetados.

14. GARANTIA

A **Biometrix Diagnóstica Ltda** situada na Rua Estrada da Graciosa, 1.081 . Curitiba . PR . CEP: 82840-360, Curitiba, Paraná, fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

Garantia

Os kits de Sequenciamento Secore® são garantidos pela Biometrix contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

Exceções na garantia:

Tem garantia restrita:

Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

Extinção da garantia:

Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA LTDA.

Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360

Tel.: (41) 2108-5250 Fax: (41) 2108-5252 DDG: 0800-7260504

E-mail: biometrix@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br

CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.

21001 Kittridge Street

Canoga Park – CA – EUA

REGISTRO ANVISA

80298490138

RESPONSÁVEL TÉCNICA

FLAVIA STIVAL

CRF/PR: 26565

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

REVISÃO	DATA	DESCRIÇÃO
00	08/12/2015	Documento novo