

PLATAFORMA TECNOLÓGICA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

Condições de Aceitação de Amostras para Análise de Fragmentos

1. Objetivo

Estabelecer o procedimento de preparo de amostras para a técnica de Análise de Fragmentos.

2. Procedimento

2.1 Preparar as amostras para a reação de análise de fragmentos seguindo os passos abaixo:

- Adquirir os primers marcados com fluorescência (FAM, VIC, NED ou PET) e o marcador de pares de bases (marcado com o LIZ), de acordo com as especificações dadas pela Plataforma de Sequenciamento de DNA;
- Adquirir junto à Plataforma de Sequenciamento de DNA a formamida necessária para preparação/injeção das amostras;
- Agendar com a equipe da Plataforma de Sequenciamento de DNA o dia e horário para a entrega das amostras;
- Realizar a reação de PCR em seu laboratório, assegurando que o mesmo tenha banda única e boa eficiência;

OBS: apresentar imagem do gel à equipe da plataforma durante a padronização.

e) Diluir a amostra com água para PCR na concentração padronizada;

OBS: Para a padronização, fazer uma diluição seriada do produto amplificado (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) de acordo com a figura abaixo.

	1	2
A	1:2	1:2
B	1:4	1:4
C	1:8	1:8
D	1:16	1:16
E	1:32	1:32
F	1:64	1:64
G	Inteiro	Inteiro
H	Form+ LIZ	Form+ LIZ

f) Colocar em cada poço da placa 1,5 µl da amostra diluída, 0,5 µl do marcador de pares de bases (LIZ) e completar o volume para 10 µl com formamida.

OBS: caso deseje, o usuário poderá desnaturar as amostras em seu laboratório, colocando as mesmas à 95°C, 3 minutos e em seguida no freezer por 2 minutos.

g) Proteger a placa com as amostras da luz, envolvendo-a em papel alumínio e entregá-la imediatamente no setor.

OBS: na impossibilidade da entrega imediata, manter a placa com as amostras à 4°C, protegida da luz, por no máximo 24 horas.

Anexo 001 – Desenho da Placa

 IGM FIOCRUZ-BA	PLATAFORMA TECNOLÓGICA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA										CLASSIFICAÇÃO: 423.1		
	FORMULÁRIO DE DESENHO DE PLACA – ANÁLISE DE FRAGMENTOS												
USUÁRIO:												DATA: ____ / ____ / ____	
Confecção:												Injeção:	
DNA:		1,5 µL										LIZ: <input type="checkbox"/> 500 <input type="checkbox"/> 600 <input type="checkbox"/> 1200	
LIZ:		0,5µL X ____ = ____ µL										Formamida: 8,0µL X ____ = ____ µL	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													