

Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz
Vice Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico- VPPCB
Rede de Plataformas Tecnológicas: Plataforma de
Sequenciamento de DNA- RPT01A
Av. Brasil , 4365 - Manguinhos – CEP 21040-900 - Rio de Janeiro- RJ

TÍTULO: Protocolo de Reação Completa - RPT01A

CÓDIGO
POP-RPT01A-02

REVISÃO
08

ELABORADOR
Beatriz de Lima Alessio Müller

REVISOR
Alexandre A. C. dos Santos

APROVADOR
Aline dos Santos Moreira

DATA
21/09/2022

1. Reação de Sequenciamento – RPT1A

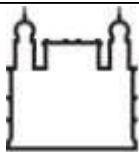
P01-001A : Reação completa de templates purificados (reação de Sanger, precipitação, ressuspensão e leitura de placa)

- Distribuir as amostras de DNA, devidamente purificadas, na placa de 96 poços (ThermoFisher - PN.:N8010560-cx c/10placas), ou em microtubos de 1,5mL.

Veja abaixo as concentrações de DNA sugeridas pelo fabricante:

Template	Quantity
PCR product:	
100-200 bp	1-3 ng
200-500bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
>2000bp	40-100 ng
Singe-stranded	50-100 ng
Double-stranded	200-500 ng
Cosmid, BAC	0.5-1.0 ug
Bacterial genomic DNA	2-3 ug

- Adicionar os iniciadores (primers), na concentração de 3,2pmols (a concentração de primer pode variar de 3,2 até 5,0 pmols por reação) e água milliq (quando necessário), totalizando um volume final 7,5 µL por poço ou por tubo;
- Calcular a mistura para a reação de sequenciamento de DNA, de acordo com o número de amostras. Para cada amostra, adicionar 1,0µL de BigDye v3.1 sequencing terminator Cycle kit (ThermoFisher - PN.: 4337455 - kit de 100 rçs – otimizado para 800 reações) e 1,5µL de tampão de sequenciamento 5x (Applied



Biosystems – PN:4336699). A placa deve ser coberta com adesivo para placa para PCR (Axygen BF-400-S ou MicroAmp Optical Adhesive Film PN:4311971 ou Adhesive PCR Film Cat: AB-0558) ou a tampa de borracha da Axxygen (AxyMat - Código CM-96-RD);

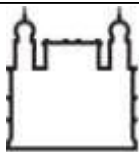
- Adicionar 2,5 µL da mistura de reação em cada poço da placa (1ul de BigDye + 1,5 de tp5x);
- Centrifugar brevemente (spin) a placa;
- No termociclador é utilizado o seguinte protocolo: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos; 40 repetições (40x) desse mesmo ciclo.

Após a reação de sequenciamento é feita uma precipitação das amostras para retirada de ddNTPs livres que podem interferir na leitura da sequência de DNA no analisador de DNA.

2. Precipitação da Reação de Sequenciamento

P01-001B : Precipitação, ressuspensão em formamida e leitura de amostra

- Após ciclagem da reação de sequenciamento, os produtos deverão passar pelo processo de precipitação que consiste em:
 - Centrifugar brevemente (spin) a placa;
 - Adicionar 30 µL (3x volume) de Isopropanol 80% (somente MERCK) em cada poço da placa ou microtubo;
 - Vortexar as amostras por 10 segundos;
 - Manter a placa em repouso, por 15 minutos, sob abrigo da luz;
 - Centrifugar por 45 minutos a 4.000 rpm (no caso de microtubos, a rotação da centrífuga deve estar acima de 13.000 rpm).
 - Descartar sobrenadante usando papel-toalha. Verter a placa sobre o papel- toalha e, através de movimentos circulares, apoiada sobre uma bancada, descartar o sobrenadante;
 - Adicionar 50 µL (5x volume) de Etanol 80% (MERCK) em cada



poço da placa;

- Centrifugar por 15 minutos a 4.000 rpm (no caso de microtubos, a rotação da centrífuga deve estar acima de 13.000 rpm);
- Descartar sobrenadante usando papel-toalha, de acordo como descrito anteriormente;
- Centrifugar a placa invertida (“spin down”), utilizando papel-toalha para absorção do etanol. Deixar chegar até 600 rpm e interromper a centrifugação;
- Colocar a placa em um bloco aquecido a 60°C por 10 minutos, sob abrigo da luz.

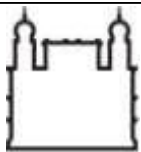
A placa seca pode ser armazenada sob abrigo da luz à -20°C, pelo tempo máximo de 30 dias, aproximadamente.

3. Desnaturação da Reação de Sequenciamento em placa

P01-001C : Ressuspensão em formamida e a leitura de amostra

- Adicionar 10µL de formamida Hi-Di (Thermo Fisher P/N:4311320) em cada poço da placa seca;
- Centrifugar brevemente;
- Colocar a placa em um bloco aquecido a 95°C por 3 minutos, sob abrigo da luz, e em seguida, colocar imediatamente no gelo por 5 a 10 minutos;
- Aplicar a septa (borracha) na Placa desnaturada;
- Centrifugar brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo;
- Levar a placa para eletroforese de capilar (ABI 3730xl ou ABI3130xl).

Caso a placa não seja submetida à eletroforese imediatamente após o processo de desnaturação, as amostras poderão ser armazenadas a 4°C por até 2 dias, ou a -20°C por 20 dias, no máximo.



4. Leitura no equipamento 3730xl

P01-001D : Leitura de reações em tubos ou placas prontas

- Entrega de material em Placa com 10µL de formamida Hi-Di (Thermo Fisher P/N:4311320) ou com 10 µL de sobrenadante do Xterminator (Thermo Fisher- P/N:4376486).
- Centrifugar brevemente;
- Colocar a placa em um bloco aquecido a 95°C por 3 minutos, sob abrigo da luz, e em seguida, colocar imediatamente no gelo por 5 a 10 minutos;
- Aplicar a septa (borracha) na Placa desnaturada;
- Centrifugar brevemente para permitir que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços concentrem-se ao fundo;
- Levar a placa para eletroforese de capilar (ABI 3730xl ou ABI3130xl).