

|                                                          |                                                                                                   |                                                                                      |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TÍTULO</b><br><b>TIPO: IT</b>                         | <b>P01-003B:</b><br><b>PRECIPITAÇÃO, RESSUSPENSÃO EM</b><br><b>FORMAMIDA E LEITURA DE AMOSTRA</b> | <b>CÓDIGO</b><br><b>RPT01E-96</b><br><br><b>CLASSIFICAÇÃO</b><br><b>SIGDA: 013.1</b> |
| <b>PALAVRA-CHAVE</b><br>Sequenciamento; reação completa. |                                                                                                   | <b>REVISÃO</b><br><b>00</b>                                                          |

## 1. OBJETIVO

Este procedimento fixa condições, padroniza, define e estabelece o procedimento para utilização do serviço “P01-003B: Precipitação, ressuspensão em formamida e leitura de amostra”, realizado da Plataforma de Sequenciamento Sanger de BH - RPT01E.

## 2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento se aplica aos usuários que optaram pelo serviço “P01-003B: Precipitação, ressuspensão em formamida e leitura de amostra” realizado pela Plataforma de Sequenciamento Sanger de BH - RPT01E.

## 3. INSTRUÇÕES

### 3.1 Identificação e forma para entrega das amostras

Todas as amostras devem estar devidamente identificadas de forma sequencial numérica. As amostras que não estiverem devidamente identificadas ou inelegíveis não serão processadas para garantirmos a qualidade dos serviços prestados.

O usuário deve entregar na plataforma, suas amostras purificadas (produto de PCR), na placa de modelo específico ou em micro tubo de 0,2mL.

Especificações de modelo de placa:

N801-0560 MicroAmp 96-Well Reaction plate Applied Biosystems

PCR-96M2-HS-C Microplaca para PCR de 96 poços, meia borda, transparente, volume 200µL, Axygen.

### 3.2 Entrega diretamente na instituição

O recebimento de amostras presencial na plataforma ocorre de segunda a sexta-feira, de 10h às 14h.

### 3.3 Preparo das amostras

O usuário deve entregar as amostras com a reação de sequenciamento já realizada com kit BigDye V3.1, seguindo a concentração e volumes conforme indicados nas tabelas seguintes.

|                                                 |                                                 |                                                   |             |                                |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|--------------------------------|
| <b>ELABORADO</b><br><br><b>RENATA DE BARROS</b> | <b>VERIFICADO</b><br><br><b>CAROLINE PENIDO</b> | <b>APROVADO</b><br><br><b>PEDRO AUGUSTO ALVES</b> | <b>DATA</b> | <b>PÁGINAS</b><br><br><b>3</b> |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|--------------------------------|

**TÍTULO**  
**TIPO: POP**

**PRECIPITAÇÃO, RESSUSPENSÃO EM  
FORMAMIDA E LEITURA DE AMOSTRA**

**CÓDIGO**  
**RPT01E-96**

| Amostras        | Concentração    |
|-----------------|-----------------|
| Produto de PCR: |                 |
| 100 - 200 pb    | 1 - 3 ng/μL     |
| 200 - 500 pb    | 3 - 10 ng/μL    |
| 500 - 1000 pb   | 5 - 20 ng/μL    |
| 1000 - 2000 pb  | 10 - 40 ng/μL   |
| >2000 pb        | 20 - 50 ng/μL   |
| Plasmídeo       | 150 - 300 ng/μL |

|        |           |
|--------|-----------|
| Primer | 5 pmol/μL |
|--------|-----------|

**Obs:** os primers forward e reverse **DEVEM** estar em poços ou tubos **SEPARADOS**. A mesma amostra conta como duas amostras/reações.

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| DNA na concentração (tabela) | 1 μL   |
| Primer 5 pmol/μL             | 1 μL   |
| Big Dye                      | 1 μL   |
| Tampão                       | 1.5 μL |
| H2O milliQ                   | 5,5 μL |
| Total da reação              | 10 μL  |

Dar um spin e utilizar o protocolo abaixo para realizar a reação:

| Desnaturação | Anelamento              | Extensão      | Extensão Final | Final             |
|--------------|-------------------------|---------------|----------------|-------------------|
|              | Ciclagem 35 a 40 ciclos |               |                | Hold              |
| 96°<br>1min  | 96°<br>15 seg           | 50°<br>15 seg | 60°<br>4 min   | 16°<br>(infinito) |

### 3.4 Envio do material

O indicado é o envio do material para realizar todo o serviço na plataforma **P01-003A: Reação completa de templates purificados (reação de Sanger, precipitação, ressuspensão e leitura de placa)** ou na etapa para ressuspensão **P01-003C: Ressuspensão em formamida e a leitura de amostra**.

Caso a opção seja por esse serviço, o envio deve ser realizado por transportadora e em gelo seco.

As amostras devem ser enviadas **PREFERENCIALMENTE** às segundas-feiras ou terças-feiras, para o endereço a seguir. Caso seja necessário o envio fora desses dias, entrar em contato.

| TÍTULO<br>TIPO: POP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | PRECIPITAÇÃO, RESSUSPENSÃO EM<br>FORMAMIDA E LEITURA DE AMOSTRA | CÓDIGO<br>RPT01E-96 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| <div><p><b>Destinatário:</b> Plataforma de Sequenciamento de DNA - RPT01E<br/>Centro de Pesquisa René Rachou</p><p><b>A/C:</b> Renata Oliveira ou Caroline Penido</p><p>Av. Augusto de Lima, 1715 – 5º Andar, sala 503 – Barro Preto<br/>Belo Horizonte – MG<br/>CEP: 30190-002</p></div> <p>Qualquer dúvida, entrar em contato pelos e-mails:</p> <p><a href="mailto:renata.ramos@fiocruz.br">renata.ramos@fiocruz.br</a><br/><a href="mailto:caroline.rocha@fiocruz.br">caroline.rocha@fiocruz.br</a></p> <p>ou pelo telefone: (31) 3349-7870.</p> |                                                                 |                     |