

TÍTULO TIPO: IT	P01-003D - LEITURA DE REAÇÕES EM TUBOS OU PLACAS PRONTAS	CÓDIGO RPT01E-103
PALAVRA-CHAVE SEQUENCIAMENTO, REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO, RESSUSPENSÃO.		REVISÃO 00

1. OBJETIVO

Este procedimento fixa condições, padroniza, define e estabelece o procedimento para utilização do serviço P01-003C: Ressuspensão em formamida e a 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 P01-003C: Ressuspensão em formamida e a 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 tiverem devidamente identificadas ou ilegíveis 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 microtubo 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:

Segunda-feira a sexta-feira de 11h - 15h.

ELABORADO RENATA DE BARROS RAMOS OLIVEIRA	VERIFICADO RAFAELLA ANTUNES MOREIRA	APROVADO PEDRO AUGUSTO ALVES	DATA	PÁGINAS 4
--	--	--	-------------	-------------------------

TÍTULO
TIPO: IT

**P01-003D - LEITURA DE REAÇÕES EM TUBOS
OU PLACAS PRONTAS**

CÓDIGO
RPT01E-103

3.3 Preparo das amostras:

Para o serviço acima descrito, o usuário deve entregar as amostras com: a reação de sequenciamento, precipitação e a ressuspensão já realizados.

3.3.1 A reação de sequenciamento: deverá ser realizada com kit BigDye V3.1, seguindo a concentração e volumes conforme indicados nas tabelas abaixo.

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		
		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

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

Dar um spin e utilizar o protocolo abaixo para realizar a reação no termociclador:

Incubar	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final
-	Ciclagem 35 a 40 ciclos			Hold
96º	96º	50º	60º	16º
1min	15 seg	15 seg	4 min	(infinito)

3.3.2 Precipitação da reação de sequenciamento: após o término da reação de sequenciamento no termociclador o usuário precisa realizar a precipitação das amostras conforme o protocolo abaixo:

- Adicionar 1μL de EDTA em cada poço;
- Adicionar 1μL de acetato de sódio em cada poço;

TÍTULO
TIPO: IT

**P01-003D - LEITURA DE REAÇÕES EM TUBOS
OU PLACAS PRONTAS**

CÓDIGO
RPT01E-103

- Adicionar 50µL de etanol 100% em cada poço;
- Selar a placa;
- Vortexar as amostras brevemente (somente para homogeneizar).
- Manter a placa em repouso, por 15 minutos;
- Centrifugar por 45 minutos a 3700 rpm (no caso de microtubos, a rotação da centrífuga deve estar acima de 13.000 rpm);
- Descartar sobrenadante na pia ou utilizando papel-toalha;
- Adicionar 100µL de Etanol 70% em cada poço da placa;
- Selar a placa novamente;
- Centrifugar por 15 minutos a 3700 rpm (no caso de microtubos, a rotação da centrífuga deve estar acima de 13.000 rpm);
- Descartar sobrenadante na pia ou utilizando papel-toalha;
- Centrifugar a placa invertida ("spin down"), utilizando papel-toalha para absorção do etanol. Deixar chegar até 1100 rpm e interromper a centrifugação.

Obs.: A placa seca pode ser armazenada à -20°C, pelo tempo aproximadamente de 30 dias.

3.3.3 Ressuspensão:

Adicionar 10µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems P/N:4311320) em cada poço da placa seca.

Obs.: Para usuários que forem enviar as amostras por transporte é necessário que envie a formamida HI-DI em um microtubo para que seja adicionada pela plataforma.

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).

TÍTULO
TIPO: IT**P01-003D - LEITURA DE REAÇÕES EM TUBOS**
OU PLACAS PRONTAS**CÓDIGO**
RPT01E-103

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 abaixo. Caso seja necessário o envio fora desses dias, entrar em contato.

Destinatário: Plataforma de Sequenciamento Sanger - RPT01E
Instituto Rene Rachou

A/C: Renata Oliveira

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715 - 5º Andar - Sala 501
Barro Preto
Belo Horizonte - MG

Qualquer dúvida, entrar em contato pelo e-mail:

renata.ramos@fiocruz.br

ou pelo telefone: (31) 3349-7870.