



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e
Coleções Biológicas - VPPCB

TERMO DE ACEITE

Este documento formaliza a prestação de serviços entre o solicitante e um espaço tecnológico de uma das Plataformas da Rede de Plataforma Tecnológica Fiocruz- RPT.

As análises realizadas pela Plataforma só podem ser utilizadas para Pesquisa.

Os resultados obtidos pertencem ao usuário. Entretanto, fotos, logos e imagens da Fiocruz ou de qualquer um dos seus Institutos, não podem ser utilizados para fins de divulgação sem autorização formal prévia da Instituição.

A Rede de Plataformas Fiocruz não disponibilizará dados de amostras, análises ou informações de pesquisas realizadas em suas Plataformas para terceiros, assegurando o sigilo entre os usuários e a Rede.

1 - CONDIÇÃO PRÉVIA

O usuário deve ter o cadastro do grupo de pesquisa aprovado pelo Sistema da Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz, disponível em <http://plataformas.fiocruz.br/>.

2 - SERVIÇO

2.1. Local:

O serviço será realizado mediante utilização do Espaço Tecnológico da Plataforma de Sequenciamento de DNA - RPT01B – localizado no Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia.

2.2. Código e nome do serviço

P01-005D: Leitura de Análise de Fragmentos (Microssatélites, MLPA ou MIRU-VNTR). OBS: outras técnicas sob consulta

2.3. Condições de aceitação e recebimento das amostras (retirado de VDP.18.004_IT_Condições de Aceitação das Amostra)

2.3.1. Só serão aceitas amostras após o agendamento prévio junto à RPT no site: <http://plataformas.fiocruz.br/>.

2.3.2. PARA SEQUENCIAMENTO DE DNA

a) PRODUTO DE PCR. Certificar-se que o amplicon possui banda única. Não é possível sequenciar produtos com bandas inespecíficas. Purificar e quantificar as amostras. Amostras com concentração inferior a 30ng/ul não serão aceitas para processamento. Caso o usuário não possa quantificar as amostras, a plataforma irá fazê-lo por amostragem e não processará amostras que não estejam com a concentração mínima exigida.

b) PRODUTO DE CLONAGEM. Devido ao elevado custo da reação de sequenciamento, a mesma NÃO DEVERÁ ser utilizada com a finalidade única de confirmação da presença do inserto no plasmídeo. Para isto, o usuário deverá escolher outra técnica com melhor custo/benefício. O usuário que for sequenciar produto de clonagem com o primer específico para o inserto, deverá certificar-se de que o mesmo está na amostra a ser sequenciada. Para isso, deverá fazer um PCR com o primer específico para o inserto e enviar a Plataforma de sequenciamento o arquivo contendo a figura do gel. Poderá também digerir o plasmídeo com enzima de restrição e enviar o arquivo contendo a figura do gel para a Plataforma. Em ambos casos, o gel deverá ter também o marcador de pares de bases aplicado ao mesmo. Após a confirmação da presença do inserto, quantificar as amostras e, se necessário, diluir em água para PCR para uma concentração em torno de 200ng/ul (nessa concentração, enviar 4uL de amostra a cada primer a ser utilizado). Amostras sem a confirmação da presença do inserto não serão processadas. O plasmídeo deve ser linearizado para ser feita a reação de sequenciamento.

c) As amostras deverão estar acondicionadas em tubos tipo eppendorff contendo a identificação das mesmas e o transporte deverá ser realizado à 4°C. O volume mínimo de amostra varia dependendo da concentração e da quantidade de primers que serão utilizados por amostra.

- Amostras com quantificação entre 30ng/uL e 60 ng/uL: deve-se multiplicar o número de primers a ser utilizado por 6 para se obter o volume de amostra

necessário. Exemplo: amostra A utilizará primers F e R, assim $2 \times 6 = 12 \mu\text{L}$ da amostra A devem ser enviados; amostra B utilizará 5 primers diversos, assim $5 \times 6 = 30 \mu\text{L}$ da amostra B devem ser enviados.

- Amostras com quantificação entre $60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$: deve-se multiplicar o número de primers a ser utilizado por 4 para se obter o volume de amostra necessário. Exemplo: amostra A utilizará primers F e R, assim $2 \times 4 = 8 \mu\text{L}$ da amostra A devem ser enviados; amostra B utilizará 5 primers diversos, assim $5 \times 4 = 20 \mu\text{L}$ da amostra B devem ser enviados.

- Amostras com quantificação entre 100 e $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$: deve-se multiplicar o número de primers a ser utilizado por 2 para se obter o volume de amostra necessário. Exemplo: amostra A utilizará primers F e R, assim $2 \times 2 = 4 \mu\text{L}$ da amostra A devem ser enviados; amostra B utilizará 5 primers diversos, assim $5 \times 2 = 10 \mu\text{L}$ da amostra B devem ser enviados.

- Amostras com concentração acima de $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$: deverá ser diluída pelo usuário em água para PCR, para alcançar uma concentração final em torno de $200 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Considerar para o volume final o mesmo cálculo do item anterior.

d) As amostras deverão estar acompanhadas de sua quantificação e dos primers necessários ao sequenciamento. Para quantificação é recomendado o uso de espectrofotômetro. As alíquotas de primers devem estar na concentração de $2 \text{ pMol}/\mu\text{L}$, em tubos tipo eppendorff, identificados e transportados à 4°C . O volume de primer é de $2 \mu\text{L}$ por fita sequenciada, sendo necessário o envio de um volume final com sobra.

e) As amostras devem ser identificadas em numeral e os primers utilizando as letras do alfabeto. O usuário deverá ter controle da identificação das suas amostras.

f) Amostras que necessitem de diluição, a mesma deverá ser feita utilizando ÁGUA para PCR. Não deve ser utilizado TE.

2.3.3. PARA ANÁLISE DE FRAGMENTOS (retirado de VDP.18.013_ IT_Preparação e Injeção de amostras Analise Fragmentos)

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;

d) 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

		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: ☐ 500 ☐ 600 ☐ 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													

2.3.4. PARA OUTROS SERVIÇOS (PLACAS PRONTAS)

a) Os usuários que desejarem, poderão encaminhar as placas contendo as reações prontas e devidamente purificadas e secas.

b) O transporte da placa deverá ser realizado protegido da luz.

OBS: Qualquer outra questão não abordada neste documento, deverá ser solucionada com o responsável pela Plataforma.

2.4. Entrega/ envio de materiais

2.4.1 O horário de funcionamento da RPT é das 8:00 às 12:00 e de 13:00 às 17:00hs

2.4.2 Após agendamento, a entrega/envio do material pelo responsável, os materiais devem ser encaminhados para o seguinte endereço:

Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-Bahia

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal. CEP: 40296-710. Salvador-Bahia

Sala das Plataformas Tecnológicas

Pavilhão Central, Térreo, sala 54, Tel.: (55-71) 3176-2441

2.5. Entrega de resultados

2.5.1. A plataforma terá um prazo de 5 a 7 dias úteis para fazer todo o processamento das amostras. Esse prazo poderá sofrer alteração a depender da demanda ou de alguma condição que não possa ser controlada pela Plataforma;

2.5.2. Os resultados obtidos serão disponibilizados através do Sistema da RPT (<http://plataformas.fiocruz.br>) ou na rede do Instituto Gonçalo Moniz, num prazo de até 48 horas após o processamento das amostras. Os resultados estarão identificados da seguinte forma:

- Identificação do poço na placa_identificação da amostra + primer_nome da placa (que é a data e o nome). extensão do arquivo

Ex.: B05_17.F_20180328.PLACA1.MISC.ab1

(Poço B05, amostra 17 com primer F, na placa 20180328.PLACA1.MISC, extensão ab1)

2.5.3. Todos os dados gerados deverão ser armazenados pelo usuário, ficando sob sua responsabilidade.

2.5.4. Após a disponibilização dos resultados, o usuário tem o prazo de 5 dias úteis para a retirada das suas amostras, caso contrário, as mesmas serão descartadas.

2.5.5. Os dados serão armazenados por 90 dias e ficarão à disposição dos usuários por esse período. A plataforma NÃO se responsabiliza por backups fora desse período.

2.5.6. A equipe de plataformas mantém o sigilo e confidencialidade sobre as informações dos usuários, amostras e dados resultantes dos serviços prestados.

3 – CLÁUSULA DE RESERVA

A Fiocruz, por meio da Vice-presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas tratará das questões não previstas neste Termo, as quais devem ser encaminhadas para a coordenação da Rede pelo e-mail: plataformas@fiocruz.br.

Declaro que li aceito as condições anteriormente apresentadas.