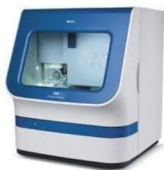


FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE AGENDAMENTO PARA A UTILIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO MULTIUSUÁRIO SEQUENCIADOR GENÉTICO DE DNA (SANGER)

DADOS DO SOLICITANTE	
Nome:	
Instituição:	
Telefone:	
E-mail:	



SOLICITAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO
Processo FAPESP 18/21193-5

Data:

Identificação da placa:

Marca e modelo da placa:

Placa para: 100 μ L () ou 200 μ L ()

Versão do BigDye usado: V1.1 () ou V3.1 ()

Método de purificação da PCR BigDye: Etanol (), Centrisep () ou XTerminator ()

Tamanho médio dos fragmentos:

Entrega do material

A **placa e as ponteiras** deverão ser entregues no Laboratório Estratégico, 10º andar, sala 1017, de segunda a sexta-feira, das 7 às 16h, (um número de ponteiras com bloqueio de 10 ou 20 μ L que correspondam ao número de amostras).

Os arquivos "1. Solicitação de Sequenciamento" e "2. Identificação das Amostras" deverão ser enviados por e-mail para: labestrategico@ial.sp.gov.br.

Os resultados serão enviados ao e-mail do usuário informado. É de responsabilidade do usuário fornecer um endereço de e-mail válido com capacidade de recebimento dos arquivos ab1.

Observações

1. No momento, o sequenciador só aceita amostras em placas de 96 orifícios para volumes de 200 μ L/well das marcas e modelos abaixo. Amostras enviadas em outro tipo de placa não poderão ser processadas.
 - a. Applied Biosystems
 - i. Cat# N8010560 (200uL) caixa com 10,
 - ii. Cat# 4316813 (200ul) caixa com 500,
 - iii. Cat# 4306737 (200 uL) caixa com 20, com barcode,
 - iv. Cat# 4326659 (200uL) caixa com 500, com barcode,
 - b. Neptune
 - i. Cat# 3742.X
 - c. Axygen
 - i. Cat# PCR-96-AB-C (321-65-051)
 - d. Abbott
 - i. Cat# 4J71-70 (96 Well optical reaction plate)
2. As corridas são realizadas por colunas (8 wells por vez = uma injeção), portanto, as amostras devem ser inseridas na placa de 96 Wells por coluna (de "A" a "H").
3. Tente otimizar a corrida fazendo, na medida do possível, um número de reações que seja múltiplo de 8 (não esquecer do pGEM neste cálculo).
4. **Cada placa deve conter, além das amostras, um pGEM feito exatamente como descrito no protocolo abaixo. Ele será o controle de qualidade da reação e sequenciamento, juntamente com um pGEM feito pelo LEIAL. Portanto, o well A1 deverá conter o pGEM feito pelo LEIAL e o well B1 vai conter o pGEM feito pelo solicitante. Assim, sua placa deve vir com o well A1 vazio. O pGEM vem junto no kit BigDye.**
5. Identificação das amostras:
 - a. O equipamento importa as informações de suas amostras, portanto usar o modelo "Identificação das amostras.txt" que fornecemos.
 - b. Para usá-lo, abrir o arquivo "txt" em Excel.
 - c. Nunca mexer em células que estejam nas linhas de 1 a 6 com excessão da célula A4 que deve ter o nome da sua placa.
 - d. Nunca mexer nas células da coluna A da planilha.
 - e. Preencha a coluna "B" com o nome de suas amostras.
 - a. **Atenção: além de letras e números, apenas "underline" é aceito**
 - f. Wells sem amostras na placa dentro de uma injeção devem ser chamados de vazio.
 - g. Quando não houver amostras em alguma coluna da placa, deixe as células da planilha vazias.
 - h. Dê um nome para seu arquivo e salve no mesmo formato ".txt"
 - i. Envie por email junto com a solicitação de sequenciamento.
 - j. **Veja exemplo abaixo:**

EXEMPLO DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA EM PLANILHA EXCEL COM EXTENSÃO .TXT

Neste exemplo existem apenas duas injeções, uma na coluna 1 e outra na coluna 3.
O nome da placa está na coluna A linha 4 (A4).
Na primeira injeção não há amostras nos wells G1 e H1 (vazio).
Nunca mexer nas linhas em Amarelo.

3500 Plate Layout File Version 1.0					
Plate Name	Application Type	Capillary Length (cm)	Polymer	Number of Wells	Owner Name
Placa XY	Sequencing	50	POP7	96	
Well	Sample Name	Assay	File Name Convention	Results Group	Sample Type
A01	pGEM LEIAL	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
B01	pGEM Cliente	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
C01	N02_17_fhbp_A1	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
D01	N02_17_fhbp_22	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
E01	N02_17_fhbp_32	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
F01	N02_17_fhbp_B2	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
G01	Vazia	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
H01	Vazia	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
A02					
B02					
C02					
D02					
E02					
F02					
G02					
H02					
A03	N03_18_fhbp_A1	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
B03	N03_18_fhbp_22	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
C03	N03_18_fhbp_32	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
D03	N03_18_fhbp_B2	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
E03	N78_16_fhbp_A1	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
F03	N78_16_fhbp_22	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
G03	N78_16_fhbp_32	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
H03	N78_16_fhbp_B2	IAL_750_Fast_Seq_Assay-POP7_12sinj	IAL	IAL	Sample
A04					
B04					
C04					



D04					
E04					
F04					
G04					
H04					
A05					
B05					
C05					
D05					
E05					
F05					
G05					
H05					
A06					
B06					
C06					
D06					
E06					
F06					
G06					
H06					
A07					
B07					
C07					
D07					
E07					
F07					
G07					
H07					
A08					
B08					
C08					
D08					
E08					
F08					
G08					
H08					
A09					
B09					
C09					

Laboratório Estratégico - Centro de Respostas Rápidas - Instituto Adolfo Lutz

Av. Dr. Arnaldo, 351, 10º andar | CEP 01246-900 | São Paulo, SP

Fone: (11) 3068-2985 | e-mail: labestrategico@ial.sp.gov.br



D09					
E09					
F09					
G09					
H09					
A10					
B10					
C10					
D10					
E10					
F10					
G10					
H10					
A11					
B11					
C11					
D11					
E11					
F11					
G11					
H11					
A12					
B12					
C12					
D12					
E12					
F12					
G12					
H12					

PROTOS UTILIZADOS NO LABORATÓRIO ESTRATÉGICO

PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR1 – AMPLIFICAÇÃO DO TEMPLATE - PRECIPITAÇÃO COM PEG

Princípio

Quando a amplificação por PCR está completa, bases nitrogenadas (dNTPs) e primers não consumidos na reação ficam remanescentes na mistura, e poderão interferir em reações subsequentes de sequenciamento. O polietilenoglicol (PEG) pode ser usado para precipitar o DNA, deixando outros produtos na suspensão líquida (sobrenadante), que podem ser descartados. PEG está disponível em uma variedade de pesos moleculares; a concentração de PEG requerida para a precipitação é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento do DNA.

Reagentes

Solução de PEG 20% (peso molecular 8000) em solução de Cloreto de sódio (NaCl) 2,5M

PEG 8000	20,0 g
NaCl	14,6 g
H ₂ O destilada qsp	100,0 mL

Obs.: Agitar com aquecimento por aproximadamente 30 a 60 minutos para dissolução do PEG (Sigma P5413). A solução ficará viscosa. Armazená-la à temperatura ambiente.

Procedimento

1. Adicionar 60 µl de PEG 20% em um tubo eppendorf de 1,5 mL;
2. Transferir 45 µl do PCR para o tubo eppendorf;
3. Misturar 10 vezes up and down;
4. Incubar por 30 min à temperatura ambiente no escuro;
5. Centrifugar a 13.000 x g por 10 min à temperatura ambiente;
6. Retirar o sobrenadante (~100 µl) com pipeta P100 e descartar;
7. Adicionar 500 µl de EtOH 80% gelado (+4°C) na parede do tubo;
8. Centrifugar a 13.000 x g por 10 min à temperatura ambiente;
9. Retirar o sobrenadante por inversão do tubo e pressioná-lo no papel toalha;
10. Secar o pellet no banho seco a 50°C por ~40 min;
11. Adicionar 30 µl de água estéril e descansar por no mínimo 1h;
12. Misturar 10 vezes up and down;
13. Dosar o DNA em NanoDrop; e
14. Estocar a -20°C.

**PREPARAÇÃO DAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO
(AMOSTRAS - PCR2)**

DNA a 50-100 ng/μL

Volume total 5 μL

Reagentes	X 1 (μL)	X ___ (μL)	25x	
dH2O	2,25		96 C	10 seg
Buffer (5x Seq Buffer)	0,75		50 C	5 seg
Big Dye Terminator (v3.1)	0,5		60 C	4 min
			4 C	∞
DNA a 50 ng/μL	1			
Total	4,5			
Por tubo	4,5			
Primer (1,6 μM)	0,5			
Total (μL)	5			

**PREPARAÇÃO DAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO
(PGEM - PCR2)**

DNA a 0,2 ug/μL

Volume total 5 μL

Reagentes	X 1 (μL)	X ___ (μL)	25x	
dH2O	2,25		96 C	10 seg
Buffer (5x Seq Buffer)	0,75		50 C	5 seg
Big Dye Terminator (v3.1)	0,5		60 C	4 min
DNA a 0,2 ug/μL	0,5		4 C	∞
Primer F M13 (0,8 μM)	1,0			
Total	5			
Por tubo	5	5		

PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR2 NAOAC/ETOH

1. Adicionar 10 ou 15µl (vol. reação 10 ou 5µl) de água destilada por reação para obter volume final de 20µl;
2. Adicionar 52µl de solução de NaOAc (3M)/ETOH por reação (**feito na hora**) e misturar com a ponteira:

NaOAc 3H ₂ O (PM: 136,08)		H ₂ O
3M	40,82 g	100 mL
3M	20,4 g	50 mL
3M	4,08 g	10 mL

NaOAc 3M µL	ETOH 100% µL	Rxn	Colunas
17,5	437	8	1
35	875	16	2
52,5	1312	24	3
70	1750	32	4
140	3500	64	8
210	5250	96	12
420	10.500	2 placas	

3. Selar com adesivo e incubar por 45 min à temperatura ambiente no escuro;
4. Centrifugar a **2750 x g** (3500 rpm) por uma hora a 4°C;
5. Verter a placa no descarte e remover o excesso de líquido com papel absorvente;
6. Utilizar um suporte nas placas, adicionar 3 folhas de papel Whatman em cima e centrifugar de forma para baixo a 500 x g (500 rpm) por 10 segundos a 4°C;
7. Adicionar 150 µl de solução de ETOH 70% à temperatura ambiente feito na hora do uso (7mL álcool + 3mL H₂O = suficiente para 6 colunas);
8. Selar com adesivo;
9. Centrifugar a 2750 x g (3500 rpm) por 30 min a 4°C;
10. Verter a placa no descarte e remover o excesso de líquido com papel absorvente;
11. Utilizar um suporte nas placas, adicionar 3 folhas de papel Whatman em cima e centrifugar de forma para baixo a 500 x g (500 rpm) por 10 seg a 4°C;
12. Deixar a placa secar por 10 min no termociclador a 35°C;
13. Selar e armazenar a -20°C até o uso.

Well A1 deve vir vazio

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pGEM LEIAL											
B	pGEM usuário											
C												
D												
E												
F												
G												
H												