



REALIZAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA (METODO DE SANGER) NA PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA DO IBCCF

ÚLTIMA ATUALIZAÇÃO: 01 DE JULHO DE 2020

A seguir são definidos os procedimentos para utilização do serviço de sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, utilizando o Sequenciador Automático 3130XL (Applied Biosystems).

1. Cadastro inicial e solicitação de uso:

a) O usuário deverá fazer um contato inicial para solicitar o sequenciamento por e-mail: sequenciamento@biof.ufrj.br. Após receber resposta, o usuário deverá entregar seu material na Plataforma de Sequenciamento de DNA, localizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Bloco G, 1º Pavimento, sala G1-043 (Telefone: 3638- 6531). **Neste momento de pandemia de COVID-19, o recebimento de novas amostras ocorrerá SOMENTE AS TERCAS-FEIRAS, de 09h30 as 12h30.**

2. Entrega do material genético

a) As amostras devem ser numeradas de forma simples e sequencial. Não serão recebidas amostras com numerações particulares de cada laboratório.

b) Caso o usuário tenha a necessidade de sequenciar de uma só vez mais de 30 amostras, recomendamos que o mesmo entregue as amostras em placa. Para tal, o usuário pode buscar a placa compatível com as especificações do fabricante na sala G1-043.

c) Em caso de sequenciamento de placa será obrigatório deixar um poço livre para que o controle da reação possa ser adicionado. Em caso de entrega de placa completa, não poderemos nos responsabilizar pela qualidade do sequenciamento obtido. O usuário deverá entregar junto com a placa uma tabela (mapa da placa) com a localização das amostras e suas denominações.

d) O usuário deverá preencher o livro de registro no laboratório no ato da entrega das amostras. As informações solicitadas são imprescindíveis para o bom processamento do material e para que tenhamos também o contato dos usuários: Data da entrega das amostras, Unidade/ Instituto, Nome, E-mail, Nome do responsável do laboratório, E-mail do responsável do laboratório, Nome do laboratório, Telefone de contato, Quantidade de amostras, tamanho do amplicon (fragmento amplificado).

e) **ATENÇÃO:** Em caso de envio de forma diferente da recomendada, o usuário será chamado para corrigir o procedimento e assim poder reenviar as amostras dentro dos padrões.

REALIZAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA (METODO DE SANGER) NA PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA DO IBCCF

f) Quantidade de DNA e primer:

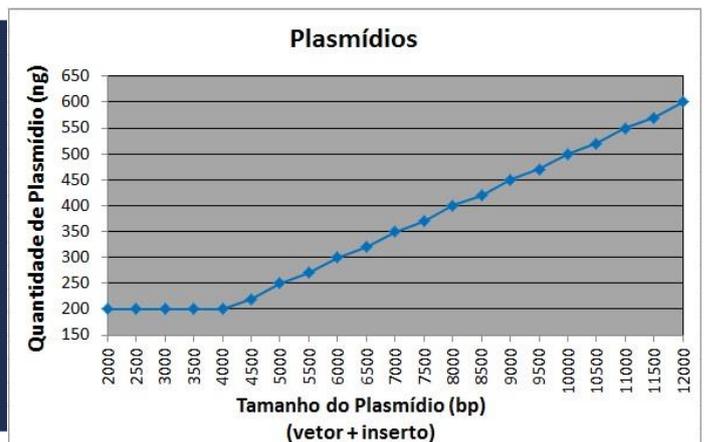
A quantidade de DNA molde a ser enviada vai depender das características do material a ser sequenciado, de acordo com a tabela e gráfico a seguir:

Produtos de PCR e outros tipos de DNA:
1 ng a 3000 ng de DNA molde

Plasmídios: concentração variável de acordo com o tamanho do plasmídio a ser sequenciado

| Amostra | Quantidade |
|---------------------------|------------|
| Produto de PCR: 100-200pb | 1-3ng |
| 200-500pb | 3-10ng |
| 500-1000pb | 5-20ng |
| 1000-2000pb | 10-40ng |
| >2000pb | 40-100ng |
| DNA fita simples | 50-100ng |
| DNA dupla fita | 200-500ng |
| Cosmídeo/BAC | 0,5-1µg |
| DNA bacteriano | 2-3µg |

Fonte: "Curso: Sequenciamento por Sanger: Análise de Dados e Resolução de Problemas – Thermo Fisher Scientific – Abril/2018"



Fonte: Protocolo de preparação da reação de sequenciamento para plasmídios - Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco – ICB – USP: <http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento/sequenciamento-de-plasmidios/protocolo-de-preparacao-da-reacao-de-sequenciamento-para-plasmidios-usuarios-da-opcao>

Concentração do primer = 3,2 pmol do primer (somente um primer por reação);

Volume final da reação (por tubo) = 7 µL;



REALIZAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA (METODO DE SANGER) NA PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA DO IBCCF

3. Reação de sequenciamento:

a) O material recebido será submetido a reação de sequenciamento, utilizando o Kit BigDye™, na temperatura padrão de anelamento da reação recomendada pelo fabricante do equipamento (50°C). Caso esta temperatura não seja adequada aos iniciadores utilizados pelo usuário, este pode obter uma alíquota do reagente de sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento e realizar sua própria reação de sequenciamento. Uma vez pronta, esta reação deverá ser entregue à plataforma onde os demais procedimentos serão realizados.

b) Após a reação de sequenciamento, ocorrerá a precipitação e posterior leitura no sequenciador capilar 3130 XL na Plataforma de Sequenciamento de DNA.

4. Resultados:

a) Os pedidos de sequenciamento serão organizados por ordem de entrada até completar a cota de uma placa do sequenciador (96 reações). Em média, o resultado será enviado em até 15 dias, a depender da demanda recebida pela Plataforma. **Neste momento de pandemia de COVID-19, o envio de resultados poderá ser um pouco maior do que o usual (em torno de 20 dias).**

b) Uma vez realizado o sequenciamento, o usuário receberá os resultados por *e-mail*. Serão encaminhados os 03 arquivos originários de cada sequenciamento. Recomendamos a análise do arquivo *.ab1*, que possui dos dados completo do sequenciamento, incluindo os valores de qualidade de cada base. Para isso pode-se utilizar o software Chomas disponível livremente. Após entregues os resultados a Plataforma manterá um *backup* dos arquivos de sequenciamento por um prazo de um ano, depois disso os arquivos serão deletados. Em caso de dúvidas quanto aos resultados, a equipe da Plataforma pode ser contactada por email para marcar um encontro presencial e esclarecer pontos da metodologia.



REALIZAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA (METODO DE SANGER) NA PLATAFORMA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA DO IBCCF

5. Rateio dos custos:

a) Será feito um rateio de **R\$ 20,00 por reação de sequenciamento**. Caso o usuário traga a placa com a reação de sequenciamento já realizada (após reação com kit Kit BigDye™), o rateio será de **R\$10,00 por reação**. Estes valores visam cobrir despesas com material de consumo de rotina dos procedimentos de sequenciamento: polímero, placas *multi-well*, tampão, capilares, *kit* de reações de sequenciamento, formamida, ponteiros para micropipetas, *kit* de calibração, além de cobrir em parte a manutenção do equipamento (principalmente a reposição do Laser).

b) Caso o sequenciamento não resulte em uma leitura de qualidade, caberá ao usuário modificar as condições de preparação do material e fornecê-lo novamente para repetir o sequenciamento. Neste caso será cobrada uma nova reação. Uma vez que sempre incluímos uma amostra controle fornecida pelo fabricante do Kit e geralmente processamos simultaneamente reações de origens diversas, é possível controlar as condições de reação e identificar se a causa do insucesso é a etapa pré-sequenciamento (mais comum) ou o sequenciamento propriamente dito. Em caso de problemas com o sequenciamento, a repetição da amostra ficará por conta da Plataforma.

c) O rateio dos custos pode ser realizado através de duas opções:

- 1) Compras de materiais de consumo, reagentes e acessórios para o sequenciador. Neste caso, enviaremos a lista de materiais necessários, que podem ser adquiridos diretamente com o fabricante do equipamento (Thermo Fisher - <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>). Caso o usuário compre material além do valor devido, o valor excedente ficará como crédito para futuras reações de sequenciamento na Plataforma.
- 2) Depósito do valor devido diretamente na conta da Plataforma, que é gerenciada por uma fundação de apoio a pesquisa. Após o pagamento, será emitida uma nota fiscal de serviços eletrônica. Informações detalhadas acerca do pagamento por essa via serão fornecidos pela empresa de apoio, na época da cobrança.

Responsáveis:

Ana Beatriz F. Pacheco – Professora associada – biafp@biof.ufrj.br

Polyana Silva Pereira – Biomédica – sequenciamento@biof.ufrj.br