



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

ÚLTIMA ATUALIZAÇÃO: 09 DE MARÇO DE 2021

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 SeqStudio™ (AppliedBiosystems – ThermoFisher).

### **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](mailto: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 ÀS TERÇAS-FEIRAS, de 09h30 às 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, mediante agendamento.
- c) Em caso de **sequenciamento de placa será obrigatório deixar 02 poços livres para que os controles da reação possam ser adicionados.** Em caso de entrega de placa completa, não poderemos nos responsabilizar pela qualidade do sequenciamento obtido. O usuário deverá entregar junto com a placa um mapa 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:

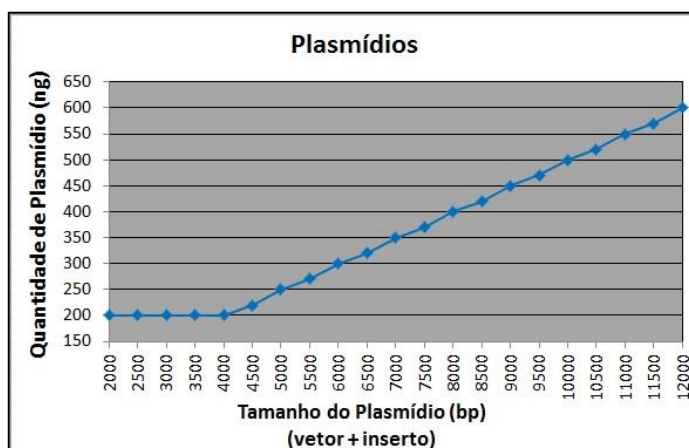
A quantidade de DNA molde a ser enviada vai depender das características do material a ser sequenciado, de acordo com a tabela e gráfico a seguir:

**Produtos de PCR e outros tipos de DNA: 01 ng a 3000 ng de DNA molde**

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"

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



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 SeqStudio™ 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 arquivos brutos originários de cada sequenciamento (*.ab1*), que possuem os dados completos do sequenciamento, incluindo os valores de qualidade de leitura de cada base. 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 *e-mail* 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\$ 25,00 por reação de sequenciamento**. Caso o usuário traga a placa com a reação de sequenciamento já realizada (após reação com kit Kit BigDye™), o valor será de R\$15,00 por reação. Estes valores visam cobrir despesas com material de consumo de rotina dos procedimentos de sequenciamento: cartucho com polímero e capilares, placas multi-well, tampão, kit de reações de sequenciamento, formamida, ponteiros para micropipetas, kit de calibração, além de cobrir em parte a manutenção do equipamento.
- 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 de custos pode ser realizado através de duas opções:
  - 1) **Principal:** Pagamento de boleto ou 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 fornecidas pela empresa de apoio, na época da cobrança.
  - 2) 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 a 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.

### Responsáveis:

Ana Beatriz F. Pacheco – Professora associada – [biafp@biof.ufrj.br](mailto:biafp@biof.ufrj.br)

Polyana Silva Pereira – Biomédica – [sequenciamento@biof.ufrj.br](mailto:sequenciamento@biof.ufrj.br)