



## Protocolo do Bioanalizador

Para utilização com o kit de DNA de alta sensibilidade da Agilente para o bioanalizador.

**Nota:** O corante e as misturas de corantes são sensíveis à luz e decompõem-se quando expostos à luz. Armazene estes reagentes num local escuro e retire as tampas de luz apenas quando estiver a fazer pipetagem. Os reagentes do bioanalizador são também sensíveis à temperatura e devem ser refrigerados a 4°C quando não estão a ser utilizados. Os reagentes devem ser deixados à temperatura ambiente antes de serem utilizados no protocolo.

**Nota:** Consulte o Guia de Iniciação Rápida do bioanalizador ou o Protocolo de Quantificação detalhada para obter assistência na configuração da estação de preparação do chip, incluindo a substituição da seringa e o ajuste da placa de base.

### Equipamento:

- Sistema de bioanalizador Agilente 2100
- Estação para preparação de chips
- Misturador vortex IKA
- Microcentrifugadora (>13000g)
- Pipetas P10, P20, P200

### Consumíveis:

- Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml de baixa aglutinação
- Pontas de pipeta: P20, P200

### Reagentes:

- Kit de DNA de alta sensibilidade da Agilente

## Preparação da mistura de corantes para gel

Este passo só deve ser efectuado se a mistura de corantes em gel tiver esgotado ou se tiverem passado mais de 6 semanas desde a última vez que preparou a mistura.

### Protocolo:

1. Deixar que o concentrado de corante de DNA de alta sensibilidade (azul) e a matriz de gel de DNA de alta sensibilidade (vermelho) atinjam a temperatura ambiente durante 30 minutos.
2. Adicionar 15 µL de concentrado de corante de DNA de alta sensibilidade (azul) a um frasco de matriz de gel de DNA de alta sensibilidade (vermelho).
3. Agitar bem a solução no vortex e centrifugar. Transferir para um filtro de centrifugação.
4. Centrifugar a 2240 g (+/- 20%) durante 15 minutos. Proteger a solução da luz. Rotular o tubo com a data de preparação e armazenar a 4°C quando não estiver a ser utilizado. Utilizar a mistura de corantes em gel preparada no prazo de 6 semanas após a preparação.



## Carregamento da mistura de gel e corante

### Protocolo:

1. Deixar a mistura gel-corante equilibrar-se à temperatura ambiente durante 30 minutos antes de a utilizar.
2. Colocar um novo chip de DNA de alta sensibilidade na estação de preparação de chips.
3. Pipetar 9µL de mistura de gel-corante para o frasco assinalado com G.
4. Certifique-se de que o êmbolo está posicionado a 1mL e, em seguida, feche a estação de preparação do chip.
5. Pressionar o êmbolo até ficar preso pelo clipe.
6. Aguarde exatamente 60 segundos e, em seguida, solte o clipe.
7. Aguarde 5 segundos e, em seguida, puxe lentamente o êmbolo para trás até à posição de 1 ml.
8. Abrir as estações de preparação do chip e pipetar 9µL de mistura de gel e corante nos recipientes marcados com G.

## Carregamento do marcador, da ladder e das amostras

### Protocolo:

1. Pipetar 5µL do marcador (verde) em todos os recipientes de amostra e de "ladder". Não deixar nenhum frasco vazio.
2. Pipetar 1µL de um ladder de DNA de alta sensibilidade (amarelo) para o frasco marcado com o símbolo do ladder.
3. Em cada um dos 11 frascos de amostra, pipetar 1µL de amostra ( frascos utilizados) ou 1µL de marcador (frascos não utilizados).

Nota: Este kit está otimizado para concentrações de DNA de 100pg/µL a 10ng/µL. Se suspeitar que as suas bibliotecas têm concentrações superiores a 10ng/µL, dilua as amostras antes de as carregar no bioanalizador.

4. Colocar o chip horizontalmente no adaptador e agitar em vórtice durante 1 min na configuração indicada (2400 rpm).
5. Coloque o chip no Bioanalizador Agilente 2100 durante 5 minutos.



## Iniciar o ciclo do bioanalizador Agilente 2100

### Protocolo:

1. Abra a tampa do Bioanalizador Agilente 2100 e introduza cuidadosamente o chip. O chip só encaixa numa posição.
2. Feche cuidadosamente a tampa e certifique-se de que o ecrã do software 2100 Expert (separador Instrumento) indica que o chip foi inserido na máquina.
3. No separador Instrumento, seleccionar o ensaio adequado (dsDNA) no menu Ensaio.
4. Actualize o Prefixo do ficheiro de modo a refletir a execução da sequenciação, o nome do lote e a data da execução.
5. Seleccione o número adequado de amostras e introduza as informações sobre as amostras na tabela de nomes de amostras abaixo.
6. Clique no botão Iniciar no canto superior direito da janela para iniciar a execução do chip. Os sinais brutos de entrada são apresentados no separador Instrumento).
7. Após o processamento do chip, retire imediatamente o chip do Bioanalizador e descarte-o. Os chips não devem ser deixados na máquina por um período superior a 1 hora.

## Limpeza dos eléctrodos após o funcionamento do bioanalizador

Limpe os eléctrodos do bioanalizador logo após cada processamento. A limpeza deve ser efectuada imediatamente após cada processamento para minimizar a contaminação.

### Protocolo:

1. Encher lentamente um dos recipientes do limpador de eléctrodos com 350 µL de água desionizada para análise. Certifique-se de que utiliza um novo limpador de eléctrodos sempre que abrir um novo kit BioAnalizador.

Nota: Se utilizar o bioanalizador para outros ensaios, é necessário efetuar uma limpeza mais rigorosa entre ensaios.

2. Abra a tampa e coloque o limpador de eléctrodos no bioanalizador, tal como colocaria um chip.
3. Feche as tampas e deixe-as fechadas durante cerca de 10 segundos.
4. Abrir a tampa e retirar o limpador de eléctrodos.
5. Esperar mais 10 segundos para permitir que a água dos eléctrodos se evapore antes de fechar a tampa..