

GUIAS DE SEQUENCIAMENTO – NÚCLEO DE GENÔMICA – LBMG

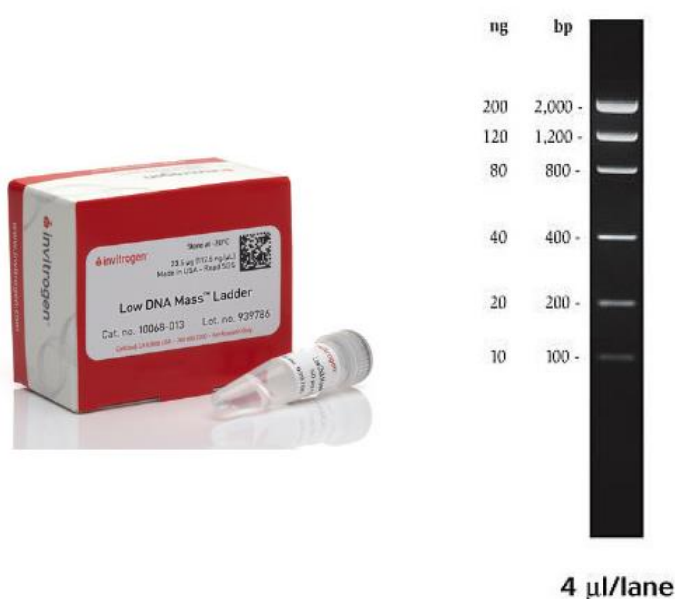
Guia para sequenciamento Sanger

Oferecemos sequenciamento de DNA a partir de produtos de PCR e plasmídeos utilizando o ABI 3500 DNA Analyzer, um sistema de análise de DNA de 8 capilares com a tecnologia ThermoFisher. As reações de sequenciamento são feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337455). As corridas são feitas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7. As sequências são analisadas pelo software Sequencing Analysis v.6 utilizando o Base Caller KB. Nossas reações de sequenciamento alcançam em média 600 a 650 bases.

Preparo da amostra:

Em nosso laboratório para realizar sequenciamento de DNA por Sanger o cliente nos fornece o produto de PCR e os primers para que a reação de sequenciamento seja feita. Os primers deverão ser entregues na concentração de 5 uM (em um volume mínimo de 10 ul) e os tubos devem estar claramente identificados. A amostra a ser sequenciada deve ter um volume mínimo de 10 ul). Solicitamos que o cliente forneça uma foto do gel de agarose com marcador de peso molecular e o(s) produto(s) de PCR a serem sequenciados. Essa etapa garante a verificação do peso e da qualidade do DNA antes de ser sequenciado.

A concentração do DNA a ser sequenciado deve obedecer a Tabela 1 e deve ser estimada aplicando-se o DNA em gel de agarose 0,7% ou 0,8% utilizando o Low DNA Mass Ladder da Invitrogen (ou marcador similar de 100 pb) e para plasmídeos o mesmo deve ser digerido com uma enzima de restrição que corte em um sítio único, de forma a lineariza-los.



O DNA pode estar diluído em H₂O ou EDTA obedecendo a Tabela 1:

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

O prazo para entrega dos resultados em formato ABI e extensão .ab1 contendo o eletroferograma ou formato FASTA em 30 dias (com a possibilidade dos resultados serem entregues antes). Os resultados são entregues aos clientes por e-mail. Os arquivos em extensão .ab1 podem ser abertos utilizando os softwares Chromas, BioEdit ou Sequence Scanner (softwares de análise de sequência que podem ser obtidos gratuitamente na internet por download).

Documentos necessários para iniciar o sequenciamento:

- 1) Foto do gel de agarose conforme descrito anteriormente
- 2) Formulário de cadastro do cliente devidamente preenchido
- 3) Formulário descritivo das amostras
- 4) Comprovante do pagamento

Guia para sequenciamento NGS

Oferecemos sequenciamento de DNA e RNA a partir de qualquer material biológico, em plataforma PGM Ion Torrent (ThermoFisher). No nosso workflow não usamos o Ion Chief e sim Ion PGM™ System & Ion OneTouch™ 2 System. Recomendamos que o usuário acesse a página da ThermoFisher e se informe sobre as aplicações disponíveis acessando o site www.ioncommunity.thermofisher.com.

Após se informar sobre a aplicação desejada, o usuário deve agendar uma reunião com a equipe do NUGEN para discutir o protocolo e tirar dúvidas (e-mail: nucleodegenomica@gmail.com).

Preparo da amostra:

A etapa de extração do ácido nucleico é de responsabilidade do cliente, mas sob consulta podemos processar a amostra e fazer a extração, o que incluiu custo adicional. Só será sequenciada a amostra que estiver satisfatória em quantidade e qualidade. Esse controle de qualidade é de responsabilidade do cliente (Gel de agarose, Bioanalyzer...)

Em geral são necessários de 20 a 100 ng de DNA para sequenciar.

O prazo para entrega dos resultados é de no máximo 30 dias. Os resultados serão entregues aos clientes por e-mail. É de responsabilidade do cliente fazer as análises de bioinformática.

Documentos necessários para iniciar o sequenciamento:

- 1) Foto do gel de agarose ou do bioanalyzer
- 2) Formulário de cadastro do cliente devidamente preenchido
- 3) Formulário descritivo das amostras
- 4) Comprovante do pagamento

Forma de Pagamento

Boleto bancário com data de vencimento para 30 dias corridos após a emissão do mesmo ou depósito em conta. Os dados para nota fiscal devem ser enviados em uma ficha impressa junto com as amostras (em anexo). As amostras não serão processadas até que a comprovação do pagamento seja efetuada.

Para evitarmos constrangimentos pedimos que, antes de enviar as amostras, o cliente verifique se será possível realizar o pagamento dentro do prazo. Caso não seja possível, então solicitamos que o cliente aguarde e envie as amostras somente no período em que o pagamento poderá ser realizado.

ANEXO I

FORMULÁRIO DE CADASTRO DO CLIENTE

Dados para nota fiscal:

Nome:	
CPF:	
RG:	
Endereço:	
Bairro:	
Cidade/Estado:	
CEP:	
Telefone (DDD):	
E-mail:	
Nº de Processo*:	

* Processo de Agências de fomento como CNPq, CAPES ou outros

Para uso interno:

--

ANEXO II

FORMULÁRIO DESCRITIVO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO SANGER

Nome do professor responsável	
Nome do aluno responsável pelas amostras, se houver	
E-mail para contato	
Telefone para contato	
Data de recebimento da amostra	
Data provável de entrega de resultados	

Descrição das amostras

Identificação das amostras no tubo	Tamanho (Kb)	Tipo de DNA*	Concentração (ng/ul)	Volume (ul)

*ssDNA, dsDNA, amplicon, plasmídeo

Observações:

ANEXO III

FORMULÁRIO DESCRITIVO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO NGS em PLATAFORMA PGM ION TORRENT (ThermoFisher)

Nome do professor responsável	
Nome do aluno responsável pelas amostras, se houver	
E-mail para contato	
Telefone para contato	
Data de recebimento da amostra	
Data provável de entrega de resultados	

Aplicação desejada

- () NGS genômico (hg19 ou hg38)
() Ampliseq
() 16S Metagenoma
() RNA-seq (expressão gênica)

Descrição das amostras:

Recomendamos que o usuário acesse a página da ThermoFisher e se informe sobre as aplicações (www.ioncommunity.thermofisher.com)