**Protocolo de PCR para sequenciamento de *Monkeypox* (2000 pb)**

**1. Soluções e reagentes**

* Primer MKPV (10 µM) – Pool 1 e Pool 2
* 5X Q5 Reaction Buffer
* dNTPs (10 mM)
* Q5 Hot Start DNA Polymerase
* Água livre de nucleases

**2. Descrição do procedimento**

1. Em sala limpa, preparar os mastermixes de cada pool em tubos separados, combinando os volumes dos componentes listados na tabela A (multiplicar pelo número de amostras que serão processadas).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tabela A: Mastermix de amplificação** | | |
|  | **Pool 1** | **Pool 2** |
| **Componentes** | **Volume (µL)/ por amostra** | **Volume (µL)/ por amostra** |
| Água livre de nuclease | 11,25 | 11,25 |
| 5X Q5 Reaction Buffer | 5,0 | 5,0 |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 | 0,5 |
| Q5 Hot Start DNA Polymerase | 0,25 | 0,25 |
| Primer (10 µM) | 3,0 | 3,0 |
| **Total** | **20,0** | **20,0** |

1. Distribuir 20,0 µL dos mastermixes do pool 1 e do pool 2 em duas placas espelhadas. Identificar as placas com a data e o pool (Ex: 02022022\_Pool1);
2. Em cabine e sala apropriadas, adicionar 5,0 µL de DNA nos poços correspondentes das placas do pool 1 e pool 2;
3. Homogeneizar gentilmente por pipetagem (10x);
4. Selar a placa com adesivo;
5. Centrifugar a 1500 x g por 1 minuto;
6. Colocar as placas em termocicladores e salvar as condições (**Programa MKPV\_pool**):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **HOLD 1** | 1 x | 98°C por 1 min |
| **CICLAGEM** | 35 x | 98°C por 20 s |
| 65°C por 1 min |
|  |  | 72°C por 4 min |
| **HOLD 2** | 1 x | 72°C por 5 min |
| **HOLD 3** | ∞ | 4°C |

1. Retirar a placa do termociclador, centrifugar (1500 x g por 1 minuto) e dar seguimento ao protocolo de sequenciamento.