

Laboratório de Genética Molecular - Nupgen - DBC/Nupélia

Table of contents

Início	5
1 O Laboratório	6
1.1 Apresentação do Laboratório	6
1.3 Linhas de Pesquisa	6
1.3.1 Taxonomia	6
1.3.2 Sistemática filogenética	6
1.3.3 Genética de populações	7
1.3.4 Biogeografia	7
1.4 Projetos do Nupgen	7
1.4.1 Peixes	7
1.4.2 Macrófitas	7
1.4.3 Parasitos	7
1.4.4 Microorganismos	8
1.4.5 Genes opsins	8
1.4.6 DNA Ambiental	8
I Protocolos	9
2 Diluições	10
2.1 Etanol	10
2.1.1 Etanol 70%	10
2.1.2 Etanol 80%	10
2.2 GelRed	11
2.3 Ladder 100pb	11
2.4 Lambda	11
2.4.1 Lambda 5ng/ L (para 1000 L)	11
2.4.2 Lambda 10ng/ L (para 1000 L)	11
2.4.3 Lambda 20ng/ L (para 1000 L)	11
2.5 Primer para uso (10 M)	12
2.6 Proteinase K 20 mg/mL	12
2.7 Tampão TBE 5x (estoque)	12
2.8 PEG 20% NaCl 2,5M (para 75 mL)	12
2.9 Diluição primer liofilizado	13

3	Extração	14
3.1	Protocolo de Extração de DNA - Promega Peixes	14
3.2	Protocolo de Extração de DNA - Promega Caramujos	15
3.3	Protocolo de Extração de DNA - Promega Macrófitas	16
3.4	Protocolo de Extração de DNA com Colunas - QIAGEN Parasitos	17
4	Eletroforese	18
4.1	Gel agarose	18
4.1.1	Gel 1%	18
4.1.2	Gel 1,4%	18
4.1.3	Gel 3%	18
4.2	Protocolo para quantificação	19
4.3	Protocolo para amplificação	19
4.4	Protocolo para purificação	19
4.5	Etc	19
4.5.1	Ladder 100 pb	19
4.5.2	Por amostra	19
4.5.3	Observações	19
5	Quantificação	20
5.1	Preparação por amostra	20
5.1.1	GelRed	20
5.1.2	Safer	20
5.2	Diluição do DNA para 5ng/ L	20
6	Amplificação	21
7	Purificação	22
7.1	Purificação com Polietilenoglicol (PEG)	22
8	Sequenciamento	23
II	Análises	24
9	Bancos de Dados Genéticos	25
9.1	GenBank	25
9.2	BOLD Systems	25
9.3	BLAST	26
10	Edição de sequências	27
10.1	Passo a passo para edição de sequências	27
11	Alinhamento	29

III Softwares	30
12 MEGA	31
13 BioEdit	32
14 RAxML	33
Referências	34

Início

Este é o livro online do **Nupgen**, o **Laboratório de Genética Molecular do Nupélia (DBC/Nupélia)**. Aqui você poderá encontrar textos explicativos sobre nossa linha de pesquisa, as metodologias utilizadas em nosso laboratório, bem como os protocolos atualizados. Este é um material introdutório destinado principalmente aos alunos do laboratório e pode servir como guia para as tarefas mais técnicas. Esperamos que ele funcione como um Procedimento Operacional Padrão (POP) em nosso laboratório, mantendo as equipes alinhadas, elevando a produtividade e evitando o desperdício de recursos dentro do laboratório. Este livro não precisa ser lido de forma sequencial e cada capítulo é independente de outros, no entanto, organizamos os capítulos seguindo a lógica de trabalho no laboratório para tornar a leitura mais fluida.

O objetivo deste livro não é substituir a colaboração entre alunos do laboratório, mas sim garantir que pequenos detalhes não sejam perdidos com o passar do tempo. Na verdade, esperamos que os tópicos deste livro sejam exaustivamente discutidos entre os alunos, a fim de melhorar este conteúdo e gerar novas perguntas que ajudem no desenvolvimento da pesquisa.

Este livro foi escrito em [Quarto](#).

Organização: Bruno Miotto

Autores: Adrian Silva, Bruno Miotto, Eloisa de Páris e Mayara Passere

1 O Laboratório

1.1 Apresentação do Laboratório

O Nupgen é o **Laboratório de Genética Molecular do Nupélia** (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura), na **Universidade Estadual de Maringá (UEM)**, Paraná, Brasil. Coordenado pela Professora Dra. **Alessandra Valéria de Oliveira**, o Nupgen conta com pesquisadores, alunos de graduação e de pós-graduação que desenvolvem pesquisas objetivando detectar polimorfismos genéticos em populações naturais.

1.2

1.3 Linhas de Pesquisa

Atualmente, o Nupgen aborda estudos relacionados a polimorfismo genético sob o escopo de uma ampla variedade de organismos: peixes, parasitas, macrófitas, macroinvertebrados, microorganismos, além de estudos utilizando DNA ambiental. Assim, os pesquisadores e alunos do laboratório conduzem as seguintes linhas de pesquisa:

1.3.1 Taxonomia

Consiste na identificação dos organismos utilizando marcadores moleculares. Projetos nessa linha de pesquisa costumam ocorrer em parceria com outros laboratórios, que contribuem com a identificação morfológica do organismo. A adição da genética molecular facilita a detecção de espécies novas, híbridos e espécies crípticas, por exemplo;

1.3.2 Sistemática filogenética

Diferente da taxonomia, projetos envolvendo Sistemática Filogenética não buscam somente identificar os organismos, mas também levantar hipóteses sobre a relação evolutiva entre eles (entre espécies de um mesmo gênero, por exemplo).

Exemplo de questão: elucidar a relação filogenética em um gênero cuja evolução das espécies seja pouco compreendida (resolução de politomias);

1.3.3 Genética de populações

A Genética de populações busca entender o fluxo gênico em uma população natural, podendo endereçar questões acerca de processos de especiação e adaptação, e podendo observar os efeitos da seleção natural, deriva genética e dos efeitos de gargalo.

Exemplo de questão: diversidade genética em uma população de peixes invasores;

1.3.4 Biogeografia

Biogeografia é uma linha de pesquisa multidisciplinar que busca entender a distribuição de um grupo de organismos em correlação com a evolução ambiental (escala de tempo geológica), gerando resultados importantes para a conservação da biodiversidade.

Exemplo de questão: detectar áreas de endemismo para macrófitas aquáticas.

1.4 Projetos do Nupgen

1.4.1 Peixes

Ictiofaunas de reservatórios aquáticos podem ser formadas por organismos nativos e invasores. O estudo de populações nativas é importante para verificar a presença e interação desses organismos de determinada região. E invasores, quando presentes, modificam o habitat e o sistema onde foram introduzidos, podendo levar a perda de biodiversidade local e alterações genéticas. Assim, estudos moleculares permitem estimar a diversidade e verificar as alterações genéticas que ocorrem nestes animais.

1.4.2 Macrófitas

As macrófitas aquáticas, quando invasoras, constituem uma ameaça em termos ecológicos e também econômicos. A correta identificação e a elucidação da diversidade genética desses organismos podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de dispersão e colonização, como também no manejo adequado das espécies.

1.4.3 Parasitos

A relação parasito-hospedeiro possui grande importância nos ambientes naturais. O conhecimento da biodiversidade de parasitos contribui com o levantamento de espécies de hospedeiros no local, além de direcionar métodos de manejo para parasitos com potencial zoonótico.

1.4.4 Microorganismos

Mesmo invisíveis a olho nu, os microorganismos possuem grande importância em ambientes aquáticos, servindo como níveis inferiores na cadeia alimentar. Alguns organismos podem influenciar na qualidade d'água, por isso conhecer a diversidade destes microorganismos é fundamental

1.4.5 Genes opsins

O estudo de proteínas visuais possibilita observar e comparar a influência de fatores ecológicos no processo evolutivo de diversas linhagens, identificando como as espécies se adaptam a diversas pressões seletivas existentes no habitat.

1.4.6 DNA Ambiental

A partir de amostras de água, é possível obter fragmentos de DNA de organismos que estiveram neste ambiente. Peixes, microorganismos, anfíbios, parasitos e muitos outros organismos deixam rastros genéticos e podemos estudá-los indiretamente a partir de técnicas de sequenciamento de nova geração.

Part I

Protocolos

2 Diluições

As diluições são um procedimento comum em laboratório que consiste em misturar uma solução concentrada com uma solução diluente para produzir uma solução de concentração conhecida. Elas são utilizadas em diversas aplicações em laboratório, como preparação de amostras para análises químicas ou biológicas, padronização de soluções e muito mais.

Para realizar uma diluição, é necessário conhecer a concentração da solução concentrada (também conhecida como solução-mãe) e a quantidade de solução diluente que será adicionada. A concentração da solução resultante (também conhecida como solução-filha) pode ser calculada usando a fórmula de diluição:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Onde $C1$ é a concentração da solução-mãe, $V1$ é o volume da solução-mãe, $C2$ é a concentração da solução-filha e $V2$ é o volume da solução-filha.

2.1 Etanol

2.1.1 Etanol 70%

Em um tubo tipo falcon, colocar:

- 70 mL de etanol absoluto
- 30 mL de água destilada

2.1.2 Etanol 80%

Em um tubo tipo falcon, colocar:

- 80 mL de etanol absoluto
- 20 mL de água destilada

2.2 GelRed

Em um tubo de 1,5 mL envolto com fita e papel alumínio, colocar:

- 1 L de GelRed (estoque)
- 500 L de água Milli-Q

2.3 Ladder 100pb

Em um tubo de 1,5 mL, colocar:

- 10 L de Ladder (estoque)
- 90 L de água Milli-Q

2.4 Lambda

2.4.1 Lambda 5ng/ L (para 1000 L)

- 9,27 L de lambda
- 990,73 L de água Milli-Q

2.4.2 Lambda 10ng/ L (para 1000 L)

- 18,56 L de lambda
- 981,44 L de água Milli-Q

2.4.3 Lambda 20ng/ L (para 1000 L)

- 37,11 L de lambda
- 962,89 L de água Milli-Q

2.5 Primer para uso (10 M)

Em um tubo, colocar:

- 10 L do primer estoque
- 50 L de água Milli-Q

2.6 Proteinase K 20 mg/mL

- 20 mg de Proteinase K (estoque)
- 1 mL de água Milli-Q

Modo de preparo: lavar bem uma espátula, esterilizar com álcool 70% e pesar a Proteinase K em um microtubo novo (1,5 mL). Adicionar a água Milli-Q e ressuspender bem com a pipeta. Agitar a solução no vórtex para homogeneizar bem. Manter no freezer.

2.7 Tampão TBE 5x (estoque)

- 54 g de Tris-Base
- 27,5 g de Ácido Bórico
- 20 mL de EDTA 0,5M pH 8,0

Completar para 1000 mL com água destilada

Modo de preparo: em um becker, colocar um pouco da água destilada. Colocar uma pulga no becker e utilizar o agitador para homogeneizar a solução. Ir adicionando aos poucos os reagentes. Ao final, utilizando uma proveta, completar o volume de água que falta e armazenar em frascos de vidro (tampa laranja). Etiquetar e autoclavar.

2.8 PEG 20% NaCl 2,5M (para 75 mL)

- 15 g de Polietilenoglicol
- 10,95 g de NaCl

Completar para 75 mL com água Milli-Q

Modo de preparo: colocar em um becker um pouco da água e misturar o Polietilenoglicol e o NaCl com um bastão de vidro até a solução ficar homogênea. Depois de homogeneizada, completar o volume de água que falta e com o auxílio de uma seringa passar a solução pelo filtro (0,2 μ M – azul). Ir colocando em tubos Falcon para autoclavar. Após autoclavada, fazer alíquotas em microtubos de 1,5 mL. Manter no freezer da geladeira.

2.9 Diluição primer liofilizado

Quantidade em nmol x 1000 / 60 = Quantidade de água Milli-Q

Acrescentar essa quantidade de água no tubo do primer

Obs: 60 porque é a concentração utilizada para diluição dos primers no laboratório (= 60 μ M)

3 Extração

3.1 Protocolo de Extração de DNA - Promega Peixes

1. Com pinça e bisturi, fracionar aproximadamente 20 mg de músculo.
2. Adicionar 400 μ L de Nuclei Lysis Solution.
3. Incubar por 30 minutos a 55°C.
4. Adicionar 10 μ L de Proteinase K 20 mg/ml.
5. Incubar a 55°C overnight ou de 2-3 horas até ficar homogêneo.
6. Adicionar 2 μ L de RNase Kit Solution e mexer a amostra por inversão.
7. Incubar 30 minutos a 37°C.
8. Deixar em temperatura ambiente por 5 minutos.
9. Adicionar 200 μ L de Protein Precipitation Solution e agitar por 20 segundos.
10. Deixar no gelo por 5 minutos.
11. Centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm.
12. Remover o sobrenadante transferindo para um tubo novo – descartar o pellet.
13. Adicionar 600 μ L de isopropanol e agitar por inversão.
14. Centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm – descartar o sobrenadante.
15. Adicionar 600 μ L de etanol 70% a temperatura ambiente.
16. Centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm – descartar sobrenadante.
17. Deixar secar – pode ser na estufa.
18. Ressuspender em 30 μ L de DNA Rehydration Solution. Deixar por 1 hora no banho a 65°C ou overnight a 4°C.

3.2 Protocolo de Extração de DNA - Promega Caramujos

1. Separar o tecido (0,5-1 cm) em um tubo de 1,5 ml.
2. Adicionar 500 μ l de Nuclei Lysis Solution.
3. Macerar o tecido com um pistilo.
4. Adicionar 17,5 μ l de Proteinase K 20 mg/ml.
5. Misturar com vórtex por 10 segundos.
6. Incubar a 55°C overnight OU incubar a 55°C por 3 horas, misturando com vórtex a cada hora.
7. Adicionar 3 μ l de RNase Solution à solução e misturar por inversão do tubo 2-5 vezes.
8. Incubar a 37°C por 30 minutos. Deixar as amostras esfriarem a temperatura ambiente por 5 minutos antes da próxima etapa.
9. Adicionar 200 μ l de Protein Precipitation Solution e misturar com o vórtex vigorosamente por 20 segundos.
10. Colocar as amostras no gelo por 5 minutos.
11. Centrifugar a 12.000 rpm por 4 minutos. A proteína precipitada formará um pellet no fundo.
12. Remover cuidadosamente o sobrenadante contendo o DNA (não retirar o pellet) e transferir para um novo tubo de 1,5 ml que já contenha 600 μ l de isopropanol (temperatura ambiente).
13. Misturar cuidadosamente a solução por inversão até os “fios” de DNA formarem uma massa visível.
14. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto. O DNA ficará visível como um pequeno pellet branco. Descartar cuidadosamente o sobrenadante.
15. Adicionar 600 μ l de etanol 70% (temperatura ambiente) e misturar cuidadosamente a solução por inversão para lavar o DNA.
16. Centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto.
17. Retirar o etanol cuidadosamente com uma pipeta sem retirar o pellet.
18. Inverter os tubos em papel e deixar secar por 10-15 minutos.
19. Adicionar 30 μ l de DNA Rehydration Solution e reidratar o DNA incubando a 65°C por 1 hora. Periodicamente misturar a solução com cuidado OU incubar a 4°C overnight.
20. Guardar o DNA extraído a 2-8°C.

3.3 Protocolo de Extração de DNA - Promega Macrófitas

1. Tubos de 1,5 mL.
2. Amostras + nitrogênio líquido (macerar).
3. Adicionar 600 μ l de Nuclei Lysis Solution (logo após macerar).
4. Banho de 15 minutos a 65°C.
5. Adicionar 3 μ l de RNase.
6. Virar o tubo 5x.
7. Colocar no banho por 15 minutos a 37°C (pode segurar na mão).
8. Deixar por 5 minutos em temperatura ambiente.
9. Adicionar 200 μ l de Protein Precipitation Solution.
10. Vórtex.
11. Centrifugar por 3 minutos a 16000j ou 13000 rpm.
12. Separar sobrenadante e descartar o resto.
13. Adicionar 600 μ l de isopropanol ao sobrenadante.
14. Virar 5x.
15. Centrifugar por 1 minuto a 16000j ou 13000 rpm.
16. Descartar sobrenadante.
17. Adicionar 600 μ l de etanol 70%.
18. Virar 5x.
19. Centrifugar por 1 minuto a 16000j ou 13000 rpm.
20. Descartar sobrenadante.
21. Deixar o tubo secar por 15 minutos na estufa.
22. Adicionar 50 μ l de DNA Rehydration Solution.

3.4 Protocolo de Extração de DNA com Colunas - QIAGEN Parasitos

1. Deixar o mínimo possível de líquido na amostra antes de começar.
2. Adicionar 180 μ L de Buffer ATL.
3. Adicionar 20 μ L de proteinase K. Misturar com vórtex e incubar a 56°C até completa lise celular (30min - 2h). Misturar com vórtex ocasionalmente durante a incubação.
4. Misturar com vórtex por 15 segundos.
5. Adicionar 200 μ L de Buffer AL. Misturar bem com vórtex.
6. Adicionar 200 μ L de etanol (96-100%). Misturar bem com vórtex.
7. Pipetar a mistura em uma coluna de centrifugação DNeasy Mini colocada em um tubo de coleta. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) por 1 minuto. Descartar o líquido filtrado e o tubo de coleta.
8. Colocar a coluna em um novo tubo de coleta do kit. Adicionar 500 μ L de Buffer AW1.

Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Descartar o líquido filtrado e o tubo de coleta.

9. Colocar a coluna em um novo tubo de coleta do kit. Adicionar 500 μ L de Buffer AW2. Centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm (20.000 x g). Descartar o líquido filtrado e o tubo de coleta.
10. Transferir a coluna para um eppendorf de 1,5 mL.
11. Adicionar 50 μ L de Buffer AE no centro da membrana da coluna para a eluição do DNA. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.
12. Descartar a coluna e guardar o DNA extraído.

4 Eletroforese

4.1 Gel agarose

4.1.1 Gel 1%

Cuba - 60 mL

0,6g de agarose
12 mL de TBE
48 mL de água destilada

Cuba - 120 mL

1,2g de agarose
24 mL de TBE
96 mL de água destilada

4.1.2 Gel 1,4%

Cuba - 120 mL

1,68g de agarose
24 mL de TBE
96 mL de água destilada

4.1.3 Gel 3%

Cuba - 120 mL

3,6g de agarose
24 mL de TBE
96 mL de água destilada

4.2 Protocolo para quantificação

4.3 Protocolo para amplificação

4.4 Protocolo para purificação

4.5 Etc

4.5.1 Ladder 100 pb

2 L de loading + 1 L de GelRed + 2 L de Ladder 100 pb

4.5.2 Por amostra

2 L de loading + 1 L de GelRed + 3 L da PCR

4.5.3 Observações

- Fio preto em cima (polo negativo) e o fio vermelho embaixo (polo positivo).
- Gel agarose 1% (pode ser reutilizado).
- Correr a 90 volts, por aproximadamente 1 hora.
- Colocar o Ladder 100 pb no primeiro poço.

5 Quantificação

- Gel agarose 1%.
- Correr por aproximadamente 40 minutos, a 100 volts.
- DNA lambda (pipetar 5 μ L de cada + 1 μ L de GelRed):
 - 5 ng/ μ L – 25 ng
 - 10 ng/ μ L – 50 ng
 - 20 ng/ μ L – 100 ng

5.1 Preparação por amostra

5.1.1 GelRed

2 μ L de DNA + 1 μ L de loading + 1 μ L de GelRed + 1 μ L de água Milli-Q*

*água Milli-Q é opcional

5.1.2 Safer

X μ L de DNA + X μ L de Safer

5.2 Diluição do DNA para 5ng/ μ L

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

C1 – concentração da amostra (inicial)

V1 – quantidade de DNA necessária (descobrir)

C2 – concentração para diluir (vai diluir para 5 ng)

V2 – volume final total (50 μ L)

OBS: Quantidade de água Milli-Q é 50 μ L menos a quantidade de DNA

6 Amplificação

7 Purificação

7.1 Purificação com Polietilenoglicol (PEG)

1. Adicionar 50 μ L de PEG 20% NaCl 25m. em um tubo de 1,5 mL.
2. Transferir a PCR para o tubo e misturar.
3. Incubar o conteúdo do tubo a 37°C por 15 minutos.
4. Centrifugar a reação + PEG por 15 minutos a 12000 rpm.
5. Retirar o sobrenadante sem tocar na parede do tubo e descartar – usar pipeta.
6. Adicionar 62,5 μ L de etanol 80% (álcool Merck) gelado no tubo – colocar na parede.
7. Centrifugar por 2 minutos.
8. Virar o tubo, descartando o sobrenadante.
9. Deixar secar até não ter mais gotas – pode ser na estufa.
10. Ressuspender com 10 μ L de água Milli-Q lavando a parede do tubo de 5 a 6 vezes.

8 Sequenciamento

Part II

Análises

9 Bancos de Dados Genéticos

9.1 GenBank

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

O GenBank é um banco de dados de sequências de DNA mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), um instituto do National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos. Ele armazena sequências de DNA de diversas fontes, incluindo genomas, sequências de expressão gênica, sequências de proteínas e etc.

O GenBank é um recurso valioso para os pesquisadores de genética molecular porque permite o acesso a uma ampla variedade de sequências de DNA, tornando mais fácil a realização de análises e pesquisas. Além disso, o GenBank permite a submissão de novas sequências de DNA pelos usuários, o que permite o compartilhamento de dados entre os pesquisadores.

Todo trabalho ao ser publicado deve submeter as sequências utilizadas para o GenBank, dessa forma outros pesquisadores podem utilizar em suas próprias análises.

9.2 BOLD Systems

Link: <http://boldsystems.org/>

O BOLD Systems (Barcode of Life Data Systems) é um projeto de ciência cidadã que visa coletar e armazenar sequências de DNA barcodes (COI) de espécies de todo o mundo. O DNA barcode é um trecho curto de DNA que pode ser usado para identificar espécies de maneira rápida e precisa. Ele é amplamente utilizado em biologia evolutiva e conservação de espécies e é uma ferramenta valiosa para a identificação de espécies em ambientes complexos, como ecossistemas tropicais.

O BOLD Systems é mantido pelo Instituto de Biodiversidade do Canadá e é uma iniciativa internacional que conta com a participação de cientistas, conservacionistas e cidadãos do mundo todo. Ele possui uma base de dados online que armazena as sequências de DNA barcodes coletadas e permite o acesso a essas sequências pelos usuários.

9.3 BLAST

Link: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

O BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) é uma ferramenta amplamente utilizada pelos pesquisadores de genética molecular para realizar buscas de sequências de DNA em bancos de dados de sequências. Ele é mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) e está disponível gratuitamente na internet.

O BLAST funciona comparando uma sequência de entrada com as sequências armazenadas em um banco de dados de referência e encontrando as sequências mais similares. Ele utiliza uma técnica de alinhamento de sequências chamada alinhamento local, que permite o alinhamento apenas de trechos similares das sequências, ignorando trechos com pouca similaridade.

O BLAST é amplamente utilizado em diversas análises de genética molecular, como a identificação de genes e/ou espécies.

10 Edição de sequências

Após enviar nossas amostras para o sequenciamento, recebemos um conjunto de arquivos com os resultados. Mas antes de utilizá-los em análises, precisamos garantir a qualidade dos dados recebidos. É normal e esperado que sejam encontrados erros de leitura do sequenciador, mas devemos tomar cuidado para tornar esse processo livre de vieses e erros de interpretação.

Os arquivos geralmente são enviados em 2 formatos, um deles é responsável pela sequência de nucleotídeos de forma básica, geralmente no formato **.fasta/.fas** (é neste formato que baixamos as sequências do [GenBank](#)) ou **.seq**, e o outro arquivo é o responsável pelos dados do eletroferograma, onde podemos observar os picos do sinal do detector do sequenciador, recebido geralmente em formato **.ab1**.

Os arquivos FASTA podem ser abertos no programa [MEGA](#) (ou mesmo no bloco de notas para uma edição rápida no nome das sequências, por exemplo), enquanto os eletroferogramas podem ser visualizados com o programa [BioEdit](#).

10.1 Passo a passo para edição de sequências

Para realizar uma edição correta e livre de vieses, vamos utilizar papel e caneta além do BioEdit e MEGA. Peça ajuda para alguém que já fez isso antes.

1. Abra o eletroferograma com o BioEdit e anote cada observação da sequência em um papel, destacando o início e final da sequência, junto da numeração do nucleotídeo e a modificação a ser feita, por exemplo:

Seq1 - A04

Início

34

----->

ATGCTA

pb 134 145 167

Antes	Y	K	W

Agora C G A

Fim

673

----->

TGCCTA

Faça isso para a sequência inteira. O ideal é que você faça isso com todas as suas sequências de uma vez.

2. Abra o MEGA e realize as edições na seguinte ordem: 1. Correções de pb, 2. Corte do final da sequência, 3. Corte do início da sequência. Isso vai garantir que os números relativos a cada nucleotídeo não mude durante a edição.

11 Alinhamento

MEGA, raxML, phyML

Adicionar referências para cada um

MEGA 7:

Part III

Softwares

12 MEGA

Talvez isso aqui se torne o 1º (ou último) capítulo da seção *Análises*

Falar das versões (7 4ever)

Prós

Contras

Usos

13 BioEdit

Prós

Contras

Usos

14 RAxML

Referências