

INSTRUÇÕES PARA O PREPARO E ENVIO DE AMOSTRAS



O LABORATÓRIO DA MYLEUS
TEM A TECNOLOGIA QUE VOCÊ PRECISA.

ÍNDICE

1 – INSTRUÇÕES GERAIS	3
2 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO	6
3 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA PURIFICAÇÃO – EXOSAP –IT	7
4 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO SANGER	8
5 – ADIÇÃO DE PRIMERS UNIVERSAIS	10
6 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA ELETROFORESE CAPILAR - ANÁLISE DE FRAGMENTOS	11
7 – PREPARO DE AMOSTRAS PARA ELETROFORESE CAPILAR – SEQUENCIAMENTO DE DNA (SANGER)	13
8 – SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)	14
9 – ENVIO DE AMOSTRAS	16
10 – SUPORTE TÉCNICO	17



INSTRUÇÕES GERAIS

- Preencher o formulário **ID 018 - Encaminhamento de Amostras (Facility)**, disponível no nosso site <http://facility.myleus.com/> e enviá-lo juntamente com as amostras.
- Informar o (s) tipo (s) de **serviço(s)** a ser (em) realizado (s):
 - ADIÇÃO DE *PRIMER* (*Forward* ou *Reverse*)
 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA
 - PURIFICAÇÃO DE DNA (ExoSap-IT)
 - SEQUENCIAMENTO DE DNA (Sanger)
 - ELETROFORE CAPILAR*

*(Quando for apenas para o serviço de eletroforese capilar informar se a eletroforese a ser realizada é para Sequenciamento de DNA ou Análise de Fragmentos)

Assinalar com um X o (s) serviço (s) a serem feitos:	<input type="checkbox"/>	Adição de <i>primer</i> ***	<input type="checkbox"/>	Quantificação de DNA
	<input type="checkbox"/>	Purificação de DNA (ExoSAP-IT)	<input type="checkbox"/>	Sequenciamento de DNA
	<input type="checkbox"/> Eletroforese Capilar (apenas injeção no equipamento)			
	Favor informar o tipo de eletroforese capilar a ser feita:			
	<input type="checkbox"/>	Sequenciamento de DNA	<input type="checkbox"/>	Análise de Fragmentos****
				****Matriz disponível: DS33 Dye-Set G5

***Favor nos contatar para verificar a lista de *primers* disponíveis.

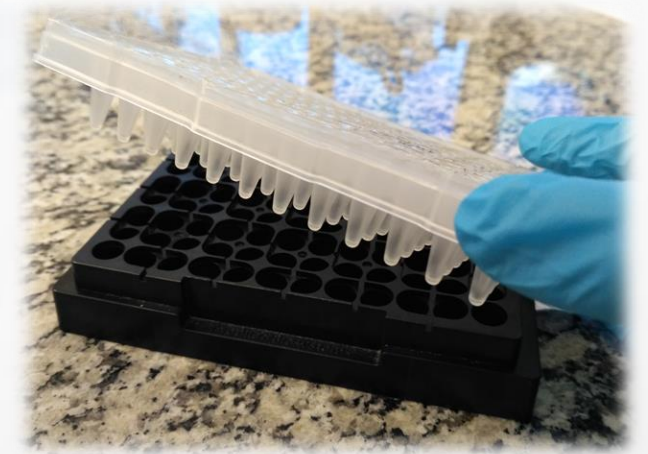
- Para o Serviço de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) preencher o formulário **ID 035**.

INSTRUÇÕES GERAIS

- As amostras podem ser enviadas em microtubo e/ou placa.

OBS: Para o **serviço de sequenciamento de DNA (Sanger)**, quando as amostras forem preparadas em microtubos, utilizar **SEMPRE** o microtubo de 0,2 mL.

- Numerar os microtubos contendo as amostras sequencialmente (EX: 1, 2, 3...), conforme a primeira coluna da tabela contida no formulário **ID 018 e/ou ID 035**.



NÃO ESCREVER O NOME DA AMOSTRA NO MICROTUBO



INSTRUÇÕES GERAIS

- No caso do uso de placa, distribuir as amostras verticalmente a partir do poço A1, fazendo a correlação com a tabela de identificação das amostras contida no **ID 018 e/ou ID 035**.
Ex: Amostra 1 - poço A1, amostra 2 - poço B1, amostra 3 – poço C1 e assim por diante.
- Caso você tenha alguma dúvida na etapa de vedação, assista ao nosso vídeo tutorial disponível em:
<http://facility.myleus.com/2016/05/11/video-tutorial-como-vedar-placa-de-96-pocos-para-envio-de-amostras/>

FIQUE ATENTO QUANTO A VEDAÇÃO DA PLACA, PARA QUE AS AMOSTRAS NÃO EVAPOREM OU SE MISTUREM DURANTE O TRANSPORTE ATÉ O LABORATÓRIO.



PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO

- Em um microtubo, colocar 10 µL da amostra* (produto de PCR purificado ou não, plasmídeo).
- Utilizar um microtubo para cada amostra.
- Enviar os *primers*** a serem utilizados para o preparo da reação de sequenciamento, separadamente.
- Informar no formulário ID 018 a correspondência de qual *primer* deve ser utilizado para o preparo de cada amostra.

Observações:

*** Caso a amostra seja sequenciada com diversos *primers*, multiplicar o volume acima pelo número de *primers* a ser utilizado para o preparo da reação de sequenciamento. Exemplo: Sequenciamento com dois *primers* (bidirecionalmente), enviar 20 µL de amostra.**

**** O volume de *primers* a ser enviado depende da quantidade de reações de sequenciamento a serem preparadas. Favor nos contatar para maiores informações.**



PREPARO DE AMOSTRAS PARA PURIFICAÇÃO- EXOSAP - IT

- Enviar um microtubo contendo 20 μ L do produto de PCR*. Utilizar um microtubo para cada amostra.
- Enviar os *primers*** a serem utilizados para o preparo da reação de sequenciamento, separadamente.

Observações:

*** Caso o produto de PCR, quando visualizado em gel, apresente um perfil com várias bandas, o tipo de purificação que nós oferecemos não pode ser aplicado neste caso.**

**** O volume de *primers* a ser enviado depende da quantidade de reações de sequenciamento a serem preparadas. Favor nos contatar para maiores informações.**



PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

- Em um microtubo de 0,2 mL ou poço da placa, colocar os itens abaixo:
 - DNA (quantidade indicada abaixo)
 - *Primer Forward* ou *Reverse* (quantidade indicada abaixo)
 - H₂O (o suficiente para completar o preparo desta “mistura” para um volume final total de 7,5 µL)



Quantidade de DNA e *Primer* recomendados para cada reação:

Para plasmídeo	100 ng
Para produto de PCR*	20 a 30 ng de DNA a cada 100 pb
Primer (F ou R)**	10 pmol (1 microlitro de uma solução a 10 µM)

*Recomendamos que nos casos em que seja utilizado produto de PCR, o mesmo deve ser **PURIFICADO** para o preparo e envio para sequenciamento. O uso de produto de PCR não purificado requer uma amplificação específica e sem excesso de *primer* para que se tenha uma boa qualidade no sequenciamento.

** Nunca usar os dois *primers* juntos no preparo das amostras para sequenciamento. Ou seja, caso o cliente deseje sequenciar uma amostra bidirecionalmente, deve-se preparar dois tubos separadamente, um contendo o *primer* F e outro o *primer* R.



EXEMPLO HIPOTÉTICO PARA O PREPARO DE UMA AMOSTRA PARA SEQUENCIAMENTO

Sequenciar uma amostra de produto de PCR purificado, cuja concentração de DNA seja 50 ng/μL e o tamanho do fragmento esperado seja de 300 pb.

ETAPA 1: Primeiro deve-se fazer o cálculo para definir a quantidade de DNA a ser utilizada no preparo da reação, levando em conta o tamanho do fragmento, neste caso 300 pb.

$$30 \text{ ng} \text{ _____ } 100 \text{ pb}$$

$$X \text{ _____ } 300 \text{ pb}$$

$$X = 90 \text{ ng}$$

→ **Quantidade total de DNA necessária para a reação**

ETAPA 2: Em seguida, calcular o volume de amostra que deve ser colocado no microtubo, levando em conta a concentração da amostra, neste caso 50 ng/μL.

$$50 \text{ ng} \text{ _____ } 1 \text{ } \mu\text{L}$$

$$90 \text{ ng} \text{ _____ } X$$

$$X = 1,8 \text{ } \mu\text{L}$$

→ **Volume de produto de PCR que deverá ser utilizado para colocar 90 ng de DNA na reação de sequenciamento.**

Após fazer as etapas 1 e 2, em um microtubo de 0,2 mL e/ou poço, colocar : **1,8 μL** de DNA (amostra) + **1,0 μL** do *primer F ou R* (10 μM) e **4,5 μL** de água, para completar o volume do preparo para **7,5 μL**.



ADIÇÃO DE *PRIMERS* UNIVERSAIS

- Para os clientes que precisam fazer o sequenciamento de DNA com o uso de *primers* universais, a Myleus possui um portfólio disponível, listado no quadro ao lado.
- Para o preparo da amostra, em um microtubo colocar o volume de DNA (explicado na etapa de PREPARO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO) e a quantidade de água, para completar um volume de 6,5 µL.
- No nosso laboratório faremos a adição do *primer* informado no formulário ID 018.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
M13 Forward (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13 Forward (-41)	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
M13 Reverse (-27)	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13 Reverse (-48)	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
16S rRNA Forward	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
16S rRNA Reverse	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT
T7 Promoter	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T3 Promoter	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG



PREPARO DE AMOSTRAS PARA ELETROFORESE CAPILAR - ANÁLISE DE FRAGMENTOS

- Para análise de fragmentos, utilizamos o equipamento ABI 3730, que permite a combinação dos seguintes fluoróforos:

Matriz	Fluorocromo	Cor
Dye-Set 33	6-FAM™	Azul
	VIC®	Verde
	NED™	Amarelo
	PET®	Vermelho
	*LIZ®	Laranja

*O marcador de peso molecular compatível com este set é o GeneScan Liz.

- As amostras já devem vir preparadas contendo (Formamida + PCR diluída + marcador de peso molecular), totalizando 10 microlitros.
- As padronizações da quantidade de amostra, size standard e formamida devem ser padronizadas pelo cliente.
- Após o preparo das amostras, selar bem a placa com o adesivo. Se possível utilizar o adesivo "MicroAmp Clear Adhesive Film, da Thermo Fisher, código: 4306311.

PREPARO DE AMOSTRAS PARA ELETROFORESE CAPILAR - ANÁLISE DE FRAGMENTOS

- Envolver a placa e/ou tubo em papel alumínio. As amostras podem ser mantidas em geladeira (4 ° C) até o envio. **Não** congelar as amostras.
- Acondicionar a placa ou tubos em isopor contendo gelo reciclável e enviar ao Laboratório da Myleus. As amostras devem chegar ao nosso laboratório em até **48 hs** após o seu preparo.



PREPARO DE AMOSTRAS PARA ELETROFORESE CAPILAR – SEQUENCIAMENTO DE DNA (SANGER)

- Para o serviço de eletroforese capilar, as amostras já devem ter passado pela reação de sequenciamento e terem sido precipitadas.
- As amostras podem ser enviadas ao nosso laboratório **COM** ou **SEM** a adição de *Formamida HIDI*.
- Caso as amostras sejam enviadas com formamida, adicionar 15 µL em cada microtubo/poço e fazer a ressuspensão do DNA precipitado.
- Envolver as amostras (placa ou microtubos) em papel alumínio.
- Acondicionar a placa ou tubos em isopor contendo gelo reciclável e enviar ao Laboratório da Myleus.



SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - NGS

- Para os serviços de NGS, o cliente deverá:
- Fornecer o DNA Extraído/Produto de PCR de suas amostras, juntamente com os dados de quantificação feito por método fluorimétrico. Para a quantificação das amostras recomendamos o Qubit®. Deve ser enviada também a foto do gel de agarose para avaliarmos a integridade do DNA.
- O material deverá ser enviado de acordo com o tipo de análise a ser feita, conforme instruções no quadro abaixo.

Tipo de Biblioteca	Tipo de Amostra a Ser Enviada	Quantidade de DNA a ser enviada	Pureza
Genomas pequenos	DNA Genômico	≥ 10 ng / μ L (500 ng de DNA Total, Volume: 50 microlitros)	OD 260/280 = 1.8 a 2.0
Amplicons	Produto de PCR amplificado com os adaptadores específicos*	≥ 20 ng / μ L (1000 ng de DNA Total, volume 50 microlitros)	OD 260/280 = 1.8 a 2.0

*** Consulte-nos para saber mais informações.**



SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - NGS

- A amostra deve ser preparada/diluída em água grau biologia molecular. **NÃO** utilizar Tampão Tris-EDTA, pois o EDTA compromete a qualidade do sequenciamento.
- As amostras devem ser acondicionadas em microtubos envolvidos em *parafilm* e identificadas de acordo com o formulário de envio de amostras (ID 035).
- As amostras de DNA Genômico e Produto de PCR devem ser enviadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável.
- Os parâmetros de qualidade serão conferidos pelo nosso laboratório e caso estejam em desacordo com o solicitado, o cliente será notificado para envio de novas amostras.





ENVIO DE AMOSTRAS

As amostras para os serviços de quantificação, purificação e sequenciamento de DNA (Sanger) podem ser enviadas por SEDEX à **temperatura ambiente** ou entregues diretamente no Laboratório da MYLEUS, em horário comercial, de 08:00 às 17:00hs.

As amostras para os serviços de Eletroforese Capilar para Sequenciamento de DNA e Análise de Fragmentos, bem como o Serviço de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) devem ser enviadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável.

A Myleus também oferece o serviço de coleta em diversos locais do Brasil, consulte-nos para maiores informações.



Não utilizar gelo em escama, pois o mesmo pode derreter e comprometer as amostras.





S U P O R T E T É C N I C O

Em caso de dúvidas, entre em contato com a nossa equipe:

Bruno Nestor

bruno.nestor@myleus.com

Rafael Melo / Pollyana de Carvalho

sequenciamento@myleus.com

(31) 3234-1842



(11) 98373-5295





FACILITY.MYLEUS.COM

Av. José Cândido da Silveira, 2100, Sl. 11
Horto Florestal – Belo Horizonte – MG
CEP: 31035-536

(31) 3234-1842 - (11) 98373-5295
myleus@myleus.com

Siga-nos nas redes sociais

