 <p>LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE ESTUDOS EM BIOLOGIA</p>	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
	Reação para sequenciamento no Sequenciador Automatizado de DNA ABI3500	POP N°31
	Data de Elaboração 02/03/16	Página 01 de 03

MATERIAL NECESSÁRIO

1. Tampão de sequenciamento 5X: Applied Biosystems – N° catálogo 4336697
2. Kit BigDYE v3.1 (100 reações): Applied Biosystems – N° catálogo 4337455
3. Microplaca de PCR 96 poços: com borda elevada ou meia borda.
 - Axygen - N° catálogo 321-65-051
 - Greiner - N° catálogo 652290
 - Microamp - N° catálogo N8010560
4. Adesivo para placa: Thermo Fisher – n° catálogo AB-0558


PROCEDIMENTO

1. Calcular a quantidade de DNA para cada amostra de acordo com a tabela a seguir:

PRODUTO DE PCR	QUANTIDADE DE DNA
100-200 pb	10ng
200-500 pb	30ng
500-1000 pb	60ng
1000-2000 pb	120ng
>2000 pb	150ng
PLASMÍDEO	700ng

Sendo o volume máximo a ser utilizado:

- 6,5µl – quando primer em concentração 5pmol/µl
- 7,0µl – quando primer em concentração 10pmol/µl

 <p>LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE ESTUDOS EM BIOLOGIA</p>	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
	Reação para sequenciamento no Sequenciador Automatizado de DNA ABI3500	POP N°31
	Data de Elaboração 02/03/16	Página 02 de 03

2. Pipetar o DNA de cada amostra na placa de PCR ou tubo devidamente identificado, trocando as ponteiros para cada amostra.

3. Preparar o mix conforme o número e o volume das amostras, adicionar o BigDYE 3.1 por último e sempre cuidar para deixar a placa ou tubo envolto com papel alumínio enquanto é transportada pelo laboratório, evitando a perda da fluorescência.

Mix	1 tubo/poço
Primer	1µl (5pmol/µl); 0,5µl (10pmol/µl)
Tampão 5x Sequencing	1,5µl
BigDYE 3.1	1,0µl
Água milliQ DEPC	q.s.p. 10µl

OBS: Apenas um primer deverá ser adicionado a cada poço, se é desejado o sequenciamento de ambas as fitas deverá ser reações separadas para o primer *forward* e outra para o *reverse*

4. Adicionar o mix na placa ou tubo e dar um spin


5. Preparar o termociclador – a temperatura de ligação será sempre a mesma, independente do primer utilizado

96°C	1min	
96°C	15seg	}
50°C	15seg	
60°C	4min	
∞ 15°C		x35 ciclos

OBS: No passo de 50°C programar a alteração da temperatura em 1°C/seg ou 30%

6. Colocar a placa ou tubo no termociclador.

7. No final da amplificação: dar um spin.

 <small>LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE ESTUDOS EM BIOLOGIA</small>	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
	Reação para sequenciamento no Sequenciador Automatizado de DNA ABI3500	POP N°31
	Data de Elaboração 02/03/16	Página 03 de 03

8. Enrolar a placa em papel alumínio e levar ao Freezer a -20°C ou precipitar as amostras seguindo o POP 032 - Reação de precipitação com etanol.EDTA para sequenciamento no Sequenciador Automatizado de DNA ABI3500.

NATUREZA DAS ALTERAÇÕES		
REVISÃO		ALTERAÇÕES
NÚMERO	DATA	