

PROTOCOLO DE QUANTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO PARA PRODUTOS DE PCR (utilizado para o MegaBACE)

Quantificar o produto de PCR

A quantificação pode ser realizada por comparação com o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose.

- *Low Mass DNA Ladder* - Invitrogen – 10068-013

Purificar o produto de PCR

A purificação pode ser realizada com colunas, através de enzimas ou com PEG. Nós no Centro de Biologia Genômica e Molecular costumamos usar enzimas ou PEG.

Purificação Enzimática:

- Exonuclease I (EXO I) – Amersham Biosciences - E70073Z (2.500U)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Amersham Biosciences - E70092X 5000U

Protocolo que usamos:

0,33 µL de EXO (3,3U)

0,33 µL de SAP (0,66U)

0,34 µL de H₂O Mili-Q

6 µL de produto de PCR

Termociclador:

30 min – 37 °C

15 min – 80 °C

O produto está pronto para o sequenciamento.

Purificação com PEG:

Ver protocolo anexo

Preparar a reação de seqüenciamento

Para o seqüenciamento, usamos as seguintes condições de reação

- X ng de DNA (de acordo com a tabela a abaixo)

Produto de PCR até 900 pb	30 – 50 ng (máximo 100 ng)
Produto de PCR acima de 900 pb	100 ng
Plasmídios	100 – 200 ng

- *Primers* para sequenciamento, com concentração entre 2 e 5 µM.

Se as reações forem mandadas já preparadas, em cada tubo coloque a amostra, *primer* e água Mili-Q para completar um volume final de 6µL.

	Quantidade
DNA	tabela acima
primer	0,25 µM (para volume final 10 ul) ou 2,5 pmol
H₂O Mili-Q	q.s.p.
Volume final	6 µL

PURIFICAÇÃO DE PCR UTILIZANDO PEG 8000

1. Verifique a qualidade do produto de PCR em gel de agarose.
2. Transfira, se necessário, o produto de PCR para um tubo de microcentrífuga de 0,5ml.
3. Adicione 1 volume de solução de PEG (PEG 8000 20% NaCl 2,5M) ao PCR.
4. Incube a 37°C por 30 minutos.
5. Centrifugue a 13.000 RPM por 20 minutos. Coloque os tubos fechados com a alça da tampa voltada para a parte externa do rotor (assim você saberá onde sedimentará o *pellet* já que não será possível vê-lo)
6. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 SUAVEMENTE.
7. Adicione 125µl de etanol 80% gelado. Espere 1 minuto e centrifugue por 2 minutos a 13000 RPM.
8. Retire o sobrenadante com o auxílio de um micropipetador P20-200 SUAVEMENTE.
9. Repita os passos 7 e 8.
10. Deixe evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou deixe sobre a bancada. Cubra com papel higiênico para que não entre sujeira no tubo.
11. Ressuspenda o *pellet* entre 5 e 15 µl* de água Milli-Q fervida por pelo menos 2 horas (*overnight* de preferência). ***O VOLUME DE ÁGUA DEPENDERÁ DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DO PCR, AJUSTE CONFORME SUA NECESSIDADE.**
12. Quantifique o produto purificado em gel de agarose. (1-2µl).