

Perguntas Frequentes

Os produtos de PCR precisam ser purificados?

Recomendamos que produtos de PCR sejam purificados de géis de agarose após eletroforese (GFX, freeze-squeeze ou a partir de tratamento enzimático), para evitar que outros produtos inespecíficos da PCR prejudiquem o resultado. Mesmo inespecíficos, estes produtos foram gerados pelo mesmo par de *primers* da reação. Se um destes *primers* for utilizado na reação de sequenciamento, será gerada a sequência sobreposta de mais de um produto. Porém, caso tenhas a certeza de que uma única banda é gerada na PCR e o consumo dos *primers* tenha sido ótimo, não necessitas purificar a amostra, apenas submetê-la na quantidade e acompanhada do *primer* adequado.

Para uma região de 1600 pb quantos *primers* são recomendados para que se obtenha uma sequência consenso de qualidade?

Sequenciamentos de amostras de boa qualidade (DNA-molde e *primer*) resultam em leituras de 800-1200 n. O sequenciamento em ambas as direções permitiriam, assim, o sequenciamento de 1.600 pb. Entretanto, somente a região central estaria presente em ambas as leituras, por sobreposição da região complementar.

Posso enviar os dois *primers* em um mesmo tubo?

Apenas um *primer* deve estar misturado ao DNA-molde por tubo. Caso dois *primers* estejam presentes, haverá a sobreposição dos eletroferogramas, isto é, dos resultados dos sequenciamentos das duas fitas do DNA-molde. Portanto, para cada produto de PCR (amplicon), dois tubos contendo os mesmos devem ser fornecidos. Em um constará o *primer* "forward", no outro o *primer* "reverse". Isto, é claro, se o sequenciamento de ambas as fitas é desejado.

Posso realizar o sequenciamento utilizando somente um *primer*?

Os sequenciamentos poderão, sim, ser realizados apenas com um *primer* (forward, p. ex.). As desvantagens óbvias são: (I) de não ser possível obter a sequência da região de anelamento do próprio *primer* e de cerca de 5-10 nucleotídeos a jusante (downstream) dos mesmos; (II) não permitir a confirmação da sequência pela fita complementar; e (III) não se obter sequências além de 800-1.200 pb. Caso os fragmentos de PCR sejam curtos, esta última não é uma desvantagem

Em qual tipo de arquivo os resultados são enviados?

Arquivos txt (texto) e ab1 (eletroferograma), que pode ser lido em programa específico da Applied Biosystems (Sequencing Analysis) ou no Chromas, publicamente disponível.

As amostras enviadas por correio precisam ser acondicionadas em gelo?

As amostras podem ser enviadas a temperatura ambiente, desde que secas utilizando uma centrífuga concentradora (*speed-vac*) para secagem de DNA. Alternativamente, as amostras podem ser secas a 60 °C em estufa por 20, 30 min. Se enviadas líquidas, recomendamos que sejam acondicionadas com placas de gelo gel.