

ANEXO I

Normas para processamento de amostras para sequenciamento no CIT.

1. EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

1.1. RNA:

Sugestões de kits: Marca Qiagen, específico para amostra utilizada.

1.2. DNA:

- Não utilizar protocolos com fenol;
- Sugestões de kits: PureLink, Qiamp.

2. QUANTIDADE/QUALIDADE DA AMOSTRA:

Para início do preparo da biblioteca, necessitamos que os ácidos nucleicos estejam conforme os seguintes critérios.

2.1. Plataforma 454

RNA

- 200 ng no volume máximo de 19 μ L;
- Razão de absorvância 260/280nm próximo a 2,0.

DNA

- 1000 ng no volume máximo de 100 μ L;
- Razão de absorvância 260/280nm: $\geq 1,8$;
- O DNA deve estar íntegro, ou seja, sem degradação. Não deve apresentar nenhuma alteração no aspecto como turbidez ou cor. Realizar a eletroforese da amostra em gel de agarose 0,8% com um DNA marcador de 10kb. **Enviar a foto do gel.**

Amplicon

- Os iniciadores utilizados para a amplificação dos amplicons devem ser desenhados conforme as recomendações da empresa ROCHE;
- Para orientações, solicitamos que entrem em contato com o suporte científico da empresa, no site www.454.com;
- A amostra, preferencialmente, não deve apresentar pequenos fragmentos (< 300bp);
- Realizar a eletroforese da amostra em gel de agarose 1% com um DNA marcador de 1kb;
- Enviar a foto do gel.

2.2. Plataforma Ion Torrent PGM

RNA

- 6 μ g em no máximo 50 μ L;
- RIN (RNA Integrity Number, visualizado através do Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano kit) em torno de 8;
- Razão de absorbância 260/280nm próximo a 2,0.

DNA

- Protocolo Ion Torrent PGM: mínimo 50 ng em no máximo 50 μ L (1ng/ μ L);
- Razão de absorbância 260/280nm: \geq 1,8 (NanoDrop).

PARA TODAS AS PLATAFORMAS

- O DNA deve estar íntegro, ou seja, sem degradação. Não deve apresentar nenhuma alteração no aspecto como turbidez, viscosidade ou cor.

Obs.: A quantidade solicitada é necessária para o preparo de **uma** biblioteca. Solicitamos que a massa e o volume enviados sejam suficientes para o preparo de **no mínimo TRÊS bibliotecas**.

3. ENVIO DA AMOSTRA

As amostras devem vir em microtubos de 1,5 – 2,0 ml.

3.1. RNA: em solução, já quantificado, em gelo seco para amostras de laboratórios de fora do Instituto Evandro Chagas e em gelo comum para as amostras vindas do Instituto Evandro Chagas de Ananindeua.

3.2. DNA: em solução, já quantificado, em gelo reciclável/gelo seco.