

## ► Extracção de ADN de mancha de sangue por Chelex® 100

### *Protocolo experimental:*

1. Num tubo “eppendorf” misturar 1ml de água desionizada estéril com uma mancha de sangue com aproximadamente 3mm<sup>2</sup>;
2. Incubar à temperatura ambiente no mínimo durante 30min., “*over-night*” no caso de manchas muito secas ou feitas em tecido, misturando ocasionalmente por inversão ou agitando suavemente no vortex;
3. Centrifugar durante 2-3min, a 14000 rpm;
4. Remover o sobrenadante com excepção de 30 - 50µl;
5. Adicionar 170µl de Chelex a 5%;
6. Incubar a 56° C durante 15-30 min;
7. Agitar no vortex durante 5-10 seg;
8. Incubar num banho de água a ferver durante 8 min;
9. Agitar novamente no vortex, mais 5-10 seg;
10. Centrifugar durante 2-3 min, a 10000 – 15000 x g.

A amostra está pronta para amplificar. O volume utilizado na amplificação depende da quantidade e qualidade do ADN extraído, variando entre cerca de 1µl e 10µl.

A extracção é guardada congelada, para evitar degradação do ADN, sendo necessário agitar e centrifugar novamente para voltar a utilizar.

É efectuado exactamente o mesmo procedimento para o(s) controlo(s) negativo(s), com excepção da adição da mancha de sangue.

## ► Purificação do ADN extraído por fenol clorofórmio

### *Protocolo experimental:*

1. Descongelar as amostras e controlo negativo e adicionar 400µl de Clorofane a cada tubo;
2. Agitar cada tubo no vortex durante 30 seg. até a solução ficar com um aspecto leitoso;
3. Centrifugar durante 3min, a 14000 rpm;
4. Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo devidamente marcado;
5. Adicionar a cada tubo 600 µl de ETOH absoluto frio;
6. Inverter suavemente e uma vez só cada tubo;
7. Incubar a – 20°C no mínimo durante 30 min., para precipitação do ADN;
8. Centrifugar durante 15 min., a 14000 rpm;
9. Decantar o etanol cuidadosamente para não perder o pellet;
10. Deixar secar o pellet à temperatura ambiente no mínimo 12 horas;
11. Ressuspender o pellet em 25 µl de H<sub>2</sub>O desionizada e autoclavada;
12. Agitar e centrifugar (a 6000rpm) brevemente;
13. Incubar a 56°C durante 15-30min.

A amostra está pronta para amplificar. O volume utilizado na amplificação depende da quantidade e qualidade do ADN sendo, por norma inferior ao necessário quando partimos duma extracção de Chelex, variando entre cerca de 1µl e 5µl.

A purificação é guardada congelada, para evitar degradação do ADN, sendo necessário agitar e centrifugar novamente para voltar a utilizar.

## ► Amplificação das regiões HVI e HVII do ADN mt

### *Protocolo experimental:*

1. Descongelar as amostras e controlo negativo, agitar e centrifugar brevemente;
2. Preparar a "Reaction Mix" para **n+1** (sendo **n** = n.º de amostras + controlo negativo de extracção + controlo(s) negativo(s) de amplificação, ou PCR negativo):
  - a. Transferir para um tubo tampão com MgCl<sub>2</sub>, para uma concentração final de 1x por amostra;
  - b. Adicionar "dNTP's", para uma concentração final de 200µM por amostra;
  - c. Adicionar cada "primer", para uma concentração final de 0,2µM por amostra.
3. Agitar no vortex e centrifugar;
4. Adicionar 5 U x (**n+1**) de "Taq Polimerase" / "Taq Gold";
5. Agitar no vortex e centrifugar;
6. Repartir H<sub>2</sub>O desionizada e autoclavada por tubo de amostra, de modo que o volume final por tubo seja de 25µl;
7. Repartir o volume de "Reaction Mix" + "Taq Gold" equivalente a 1 amostra por cada um dos tubos;
8. Adicionar 10-100ng de ADN, e volume equivalente de água no PCR negativo;
9. Agitar no vortex e centrifugar, brevemente;
10. Colocar as amostras no termociclador e seleccionar o programa desejado.

Terminada a amplificação o produto é guardado congelado, para evitar degradação do ADN, sendo necessário agitar e centrifugar novamente para voltar a utilizar. Caso o produto amplificado seja purificado pouco tempo após a sua amplificação é suficiente que seja guardado a 4º C.

## ► Purificação por AutoSeq™ G-50

### *Protocolo experimental:*

1. Descongelar as amostras e controlos (se necessário), agitar e centrifugar;
2. Agitar gentilmente as colunas "AutoSeq G-50" para ressuspender a resina;
3. Quebrar o fundo da coluna e rejeitar;
4. Colocar a coluna num tubo "eppendorf" de 1,5ml;
5. Centrifugar por 1 min. a 2000 x g, com a tampa ligeiramente aberta;
6. Rejeitar o tubo com H<sub>2</sub>O e transferir a coluna para um tubo "eppendorf" de 1,5ml novo e devidamente marcado;
7. Aplicar o total da amostra (25µl) no centro da resina, sem lhe tocar;
8. Centrifugar por 1 min. a 2000 x g, com a tampa ligeiramente aberta, de modo a recolher a amostra purificada;
9. Rejeitar o tubo da resina e colocar a tampa no tubo "eppendorf" com a amostra.

A purificação é guardada congelada, para evitar degradação do ADN, sendo necessário agitar e centrifugar novamente para voltar a utilizar.

## ► Sequenciação cíclica com DRhodamine ou BigDye Terminators

### *Protocolo experimental:*

1. Descongelar o produto amplificado e controlos, agitar e centrifugar brevemente;
2. Preparar a "Reaction Mix" para **n+1** (sendo **n** o n.º de amostras):
  - a. Transferir para um tubo 4µl x (n+1) de Kit;
  - b. Adicionar 3,2 pmol x (n+1) de cada "primer".
3. Agitar no vortex e centrifugar;
4. Repartir H<sub>2</sub>O desionizada e autoclavada por tubo de amostra, de modo que o volume final por tubo seja de 20µl;
5. Repartir o volume de "Reaction Mix" equivalente a 1 amostra para cada um dos tubos;
6. Adicionar 4µl de ADN (produto amplificado);
7. Agitar no vortex e centrifugar, brevemente;
8. Colocar as amostras no termociclador e seleccionar o programa desejado.

O produto da sequenciação é guardado congelado, para evitar degradação do ADN, sendo necessário agitar e centrifugar novamente para voltar a utilizar.

## ► Purificação por precipitação com Etanol e Cloreto de Magnésio

*dRhodamine™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*

### ***Protocolo experimental:***

1. Descongelar o produto sequenciado, agitar e centrifugar brevemente;
2. Preparar a solução de 70% EtOH / MgCl<sub>2</sub> (0,5mM):
  - a. Transferir para um tubo 55μl x (n+1) de EtOH (95%);
  - b. Adicionar 19μl x (n+1) de MgCl<sub>2</sub> (2mM).
3. Agitar no vortex e centrifugar;
4. Transferir a amostra para um tubo de 0,5ml devidamente identificado;
5. Repartir 74μl da solução de EtOH / MgCl<sub>2</sub> para cada um dos tubos;
6. Agitar brevemente no vortex;
7. Incubar as amostras por cerca de 30 min (precipitação dos fragmentos de sequenciação);  
**Nota:** um tempo de precipitação inferior a 5min pode resultar na não precipitação dos fragmentos mais pequenos, bem como uma precipitação muito longa, mais de 24 horas, precipita também terminadores.
8. Centrifugar a 14000rpm, durante 15-30 min;
9. Recolher cuidadosamente e de imediato a solução etanólica (sobrenadante) o mais possível com uma pipeta;
10. Se necessário centrifugar novamente os tubos, com a mesma orientação, por 10 seg, para aspirar todo o sobrenadante sem perder o pellet;
11. Deixa-se secar as amostras à temperatura ambiente, num mínimo de 12 horas ou a 90°C durante 1 min.

Após a purificação as amostras e controlos sequenciados são preparadas de seguida para serem aplicadas no gel para análise. Caso não seja possível proceder de imediato à sua análise estas devem ser conservadas a - 20°C até serem analisadas, como estão, secas.

## ► Purificação por precipitação com Etanol

*BigDye™ v3.0 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*

### ***Protocolo experimental:***

1. Descongelar o produto sequenciado, agitar e centrifugar brevemente;
2. Preparar a solução de EtOH a  $60 \pm 3\%$ :
  - a. Transferir para um tubo  $64\mu\text{l} \times (n+1)$  de EtOH (95%);
  - b. Adicionar  $16\mu\text{l} \times (n+1)$  de H<sub>2</sub>O desionizada.
3. Agitar no vortex e centrifugar;
4. Transferir a amostra para um novo tubo de 0,5ml devidamente identificado;
5. Repartir  $80\mu\text{l}$  da solução de EtOH a  $60 \pm 3\%$  para cada um dos tubos;
6. Agitar brevemente no vortex;
12. Incubar as amostras por cerca de 30 min (precipitação dos fragmentos de sequenciação);  
**Nota:** um tempo de precipitação inferior a 15min pode resultar na não precipitação dos fragmentos mais pequenos, bem como uma precipitação muito longa, mais de 24 horas, precipita também terminadores.
7. Centrifugar a 14000rpm, durante 15-30 min;
8. Recolher cuidadosamente e de imediato a solução etanólica (sobrenadante) o mais possível com uma pipeta;
9. Se necessário centrifugar novamente os tubos, com a mesma orientação, por 10 seg, para aspirar todo o sobrenadante sem perder o pellet;
10. Deixa-se secar as amostras à temperatura ambiente, num mínimo de 12 horas.

Após a purificação as amostras e controlos sequenciados são preparadas de seguida para serem aplicadas no gel para análise. Caso não seja possível proceder de imediato à sua análise estas devem ser conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem analisadas, com estão, secas.

► **Preparação das amostras para a aplicação em gel “*Long Ranger*”**

***Protocolo experimental:***

1. Preparar o tampão de carga, para **n+1** aplicações (**n** – nº de tubos de produto sequenciado e purificado), misturando na razão de 5:1:
  - a. Formamida desionizada;
  - b. EDTA (pH 8,0) 20mM e Dextran blue (50mg/ml).
2. Agitar no vortex e centrifugar;
3. Ressuspender o pellet de cada amostra com 4µl de tampão de carga;
4. Agitar no vortex e centrifugar;
5. Aquecer as amostras a 95° C por 2 min;
6. Colocar em gelo até à aplicação.