

Protocolo de Precipitação da Reação de Sequenciamento com
EDTA/NaOAc/Etanol – Amy Smith

Não deixar a reação de sequenciamento *overnight* na placa para evitar a evaporação.

Precipitar as amostras logo após o fim da reação de sequenciamento.

1. Pipetar 1 μ L de EDTA 125mM em cada amostra, liberando o reagente dentro da amostra.
2. Pipetar 1 μ L de Acetato de Sódio 3M, liberando o reagente dentro da amostra.

! O Acetato de Sódio é bem volátil, não deixar o frasco aberto além do necessário, para não alterar a concentração.

3. Pipetar 32 μ L de etanol 95% e passar no vortex gentilmente.

! O etanol é bastante volátil, não deixar o frasco aberto além do necessário, para não alterar a concentração.

4. Deixar à temperatura ambiente por 15 minutos no escuro;
5. Centrifugar a 2340xg (RCF) por 30 minutos.

! A centrifugação está em RCF. Sempre conferir!!

6. Imediatamente após a centrifugação, remova o sobrenadante, invertendo rapidamente na pia ou sobre um papel toalha.

! Caso a inversão de todas as amostras não ocorra dentro de 5min, será necessário centrifugar novamente por 2min a 2340xg, para re-precipitar o pellet.

! Não inverta mais de uma vez.

7. Placa - Inverta sobre um papel toalha e dê um spin a 200xg por 1minuto.

Tubo – Retire o excesso com ponteira branca no lado oposto do pellet.

8. Pipetar 35 μ L de etanol 70% para cada amostra.
9. Centrifugar a 2340xg por 15 minutos.

10. Placa - Inverta conforme item 6 seguido de um spin a 200xg por 1minuto.

Tubos - Secar no termociclador com as tampas abertas (tubos e termociclador) a 55°C até todo o etanol evaporar. Verifique se foi suficiente para remover todo o etanol (provoca manchas fluorescentes nas sequências).

11. Guardar a placa envolta em papel alumínio no freezer a -20°C por no máximo 1 mês.

Álcool 70% (a partir do álcool 95%) P/ 30 mL: 22 mL álcool 95% 8 mL água
--