

Quantidade ideal de DNA para o sequenciamento

Antes de fazer a reação de sequenciamento é importante saber a quantidade de DNA do seu produto de PCR. Utilize o *Low Mass DNA Ladder* para ter uma estimativa da quantidade de DNA em sua amostra. Tanto pouco quanto excesso de DNA podem gerar sequências de má qualidade.

Produto de PCR	Quantidade
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
> 2000 bp	40-100 ng
DNA fita simples	50-100 ng

Protocolo de reação de Sequenciamento

As amostras a serem sequenciadas no 3500 deverão ser preparadas em placas, caso já não estejam desde a PCR ou purificação.

Reagente	Quantidade
Água ultrapura	4 μ L
Tampão 5X	3,7 μ L
Primer (5 μ M)	1,0 μ L
Big Dye	0,3 μ L
Volume total do mix	9 μ L
DNA	1 μ L
Volume total da reação	10 μ L

Perfil no seqüenciador (duração aproximada: 3h)

96°C - 1min
96°C - 15s
50°C - 15s
60°C - 4min
8°C - ∞

} 35X

As amostras devem ser precipitadas em seguida. Não armazenar por mais de um dia e não deixar *overnight* no termociclador. Caso a placa seja guardada antes da precipitação, envolva-la em papel alumínio.