

Preparo das amostras e Orientações de Envio

Este documento tem o objetivo de orientar o preparo de amostras, quantificação e avaliação prévia de qualidade de amostras de DNA ou RNA que serão submetidas à sequenciamento por ordem da GenOne Biotechnologies. As informações aqui prestadas são essenciais para evitar custos excessivos com o reenvio de amostras e para o sucesso do seu projeto.

I. Especificação das amostras

A qualidade das amostras tem um impacto direto na qualidade do sequenciamento e subsequente análise bioinformática. As amostras irão passar por um extensivo controle de qualidade para o processamento correto de todo o serviço e oferecer as garantias especificadas quando contratado.

Se as amostras não atenderem as especificações mínimas não será possível alcançar dados de alta qualidade. Sempre entre em contato com o suporte técnico da GenOne antes de enviar as amostras.

Notas:

- 1) A quantificação das amostras deverá ser feita pelo Qubit® e não pelo NanoDrop™, a concentração das amostras e quantidade final deve atender as especificações da GenOne.
- 2) As amostras que não atenderem as especificações serão designadas como "em risco" e o cliente decidirá sobre o seu processamento e deverá pagar pelo serviço mesmo que não atenda as especificações. Entre em contato com o gerente do seu projeto em caso de dúvidas.

1. Sequenciamento completo de Genoma/Exoma Humano

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	Pureza (NanoDrop™/Agarose Gel)
		Recomendado	Necessário			
Sequenciamento completo de Genoma/Exoma Humano	DNA genômico	≥ 2 µg	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
	Produto de PCR para genoma de célula única	≥ 2 µg	≥ 1 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	Os fragmentos precisam ser maiores que 500 bp
	FFPE*	≥ 3 µg	≥ 1.5 µg	-	-	Os fragmentos precisam ser maiores que 1500 bp

* Formalin-fixed, paraffin-embedded

2. Sequenciamento de Região alvo

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	Pureza (NanoDrop™/Agarose Gel)
		Recomendado	Necessário			
Captura de região alvo	DNA genômico	≥ 1 µg	≥ 500 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
	Produto de PCR para genoma de célula única	≥ 1 µg	≥ 500 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	Os fragmentos precisam ser maiores que 500 bp
	FFPE*	≥ 2 µg	≥ 1 µg	-	-	Os fragmentos precisam ser maiores que 1500 bp

3. Sequenciamento de Plantas e Outros Animais

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	Pureza (NanoDrop™/Agarose Gel)
		Recomendado	Necessário			
≤ 500 bp Insert	DNA genômico	≥ 1.4 µg	≥ 700 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
	Mitochondrion/Chloroplast DNA	≥ 1.6 µg	≥ 800 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	
Genotipagem por Sequenciamento	DNA genômico	≥ 500 ng	≥ 300 ng	≥ 10 µL	≥ 50 ng/µL	
2 Kb Insert	DNA genômico	≥ 30 µg	≥ 15 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	
5 Kb Insert	DNA genômico	≥ 30 µg	≥ 15 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	
10 Kb Insert	DNA genômico	≥ 50 µg	≥ 25 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	
> 10 Kb Insert	DNA genômico	≥ 80 µg	≥ 40 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	

4. Sequenciamento de Genomas de Microorganismos

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	Pureza (NanoDrop™/Agarose Gel)
		Recomendado	Necessário			
≤ 500 bp Insert	DNA genômico	≥ 1.6 µg	≥ 800 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
Meta Library	DNA genômico	≥ 1.6 µg	≥ 800 ng	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	Os fragmentos deverão ser maiores que 500 bp
PCR-Free Library	DNA genômico	≥ 10 µg	≥ 5 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
	Produtos de PCR*	≥ 400 ng	≥ 200 ng	≥ 10 µL	≥ 20 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
	Produtos de PCR**	≥ 200 ng	≥ 100 ng	≥ 10 µL	≥ 20 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.

* Um produto de PCR para cada biblioteca

** Múltiplos produtos de PCR para uma mesma biblioteca (pelo menos 2 produtos de PCR distintos)

5. Sequenciamento Epigenético

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	Pureza (NanoDrop™/Agarose Gel)
		Recomendado	Necessário			
Whole Genome Bisulfite Sequencing	DNA genômico (Genoma ≤ 1.5 G)	≥ 6 µg	≥ 3 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	OD260/280 = 1.8 – 2.0, sem degradação ou contaminação.
	DNA genômico (1.5G < Genoma ≤ 3.5 G)	≥ 12 µg	≥ 6 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	
ChIP-Seq	ChIP-Seq DNA	≥ 100 ng	≥ 50 ng	≥ 10 µL	≥ 50 ng/µL	Main peak of 100 bp – 500 bp

6. Sequenciamento de Transcriptoma

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	RNA Integrity Number (Agilent 2100)	Pureza (NanoDrop™)
		Recomendado	Necessário				
RNA-Seq Eucariótico	RNA Total (Animal)	≥ 2.6 µg	≥ 1.3 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.8, linha base sem interferências	OD260/280 = 1.8 – 2.2, OD260/230 ≥ 2.0, sem degradação ou contaminação
	RNA total (Plantas e Fungos)	≥ 2.6 µg	≥ 1.3 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.3, linha base sem interferências	
RNA-Seq procariótico	RNA Total	≥ 6 µg	≥ 3 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.0, linha base sem interferências	

7. Sequenciamento de small-RNA

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	RNA Integrity Number (Agilent 2100)	Pureza (NanoDrop™)
		Recomendado	Necessário				
small RNA Eucariótico	RNA Total (Animal)	≥ 6 µg	≥ 3 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 8, linha base sem interferências	OD260/280 = 1.8 – 2.2, OD260/230 ≥ 2.0, sem degradação ou contaminação
	RNA (Plantas e Fungos)	≥ 6 µg	≥ 3 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 7.5, linha base sem interferências	

8. Sequenciamento de lnc-RNA

Tipo de biblioteca	Tipo de amostra	Quantidade (Qubit®)		Volume	Concentração	RNA Integrity Number (Agilent 2100)	Pureza (NanoDrop™)
		Recomendado	Necessário				
lnc-RNA Eucariótico	Total RNA (Animal)	≥ 5 µg	≥ 2.5 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.8, linha base sem interferências	OD260/280 = 1.8 – 2.2, OD260/230 ≥ 2.0, sem degradação ou contaminação
	RNA Total (Plantas ou Fungos)	≥ 5 µg	≥ 2.5 µg	≥ 20 µL	≥ 50 ng/µL	≥ 6.3, linha base sem interferências	

9. Bibliotecas pré-preparadas

(1) Volume de biblioteca Necessária:

Quantidade de Dados	Volume Necessário*
< 30 G	$\geq 10 \mu\text{L}$
$\geq 30 \text{ G}$	$\geq 20 \mu\text{L}$

*Amostras com altas concentrações precisam ser diluídas antes de serem enviadas.

(2) Concentração das bibliotecas: Qubit® 2.0 (Life Technologies): $\geq 0.5 \text{ ng/uL}$

(3) Tamanho dos insertos: diluir para $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ antes de checar o tamanho pelo Agilent 2100 Bioanalyzer.

- a) Tamanho do Inseto: inserto + adaptadores (120 bp) $\pm 50 \text{ bp}$ (Não se aplica à bibliotecas de small-RNA)
- b) Pico principal presente, sem múltiplos picos, sem contaminação de adaptadores e sem dímeros de primers.

(4) Concentração da biblioteca obtida por Q-PCR:

Plataforma	Concentração Requerida
HiSeq 2500	2 nM – 30 nM
MiSeq	4 nM – 30 nM
HiSeq X	3 nM – 30 nM

II. Instruções de Pré-Controle de Qualidade (QC)

Os clientes devem fornecer os resultados das análises de qualidade da amostra usando um dos seguintes métodos: Qubit®, NanoDrop™, eletroforese em gel de agarose, ou Agilent 2100. Recomenda-se que as amostras sejam analisadas por Qubit/PicoGreen/eletroforese (com indicador de quantidade), de modo que os resultados correspondam com o nosso QC. A quantificação por NanoDrop™ NÃO é recomendada. Se o NanoDrop™ for utilizado para quantificação pré-QC, recomendamos que você envie maior quantidade de DNA / RNA do que é indicados acima.

Para eletroforese em gel, são recomendadas as seguintes condições:

DNA: 1.0% agarose gel; 1.0% TAE ; 100V por 40 min

RNA: 1.0% agarose gel; 0.5× TBE ; 180V por 16 min

Nota:

Condições de eletroforese diferentes podem gerar resultados diferentes, e um QC potencialmente enganoso. Portanto, é altamente recomendado a adesão às condições recomendadas acima para a verificação inicial, e que seja fornecida uma imagem referente ao gel obtido.

III. Exemplos de Amostras de DNA e RNA Qualificadas

1. Marcadores

Nosso QC utiliza os seguintes marcadores de peso molecular :

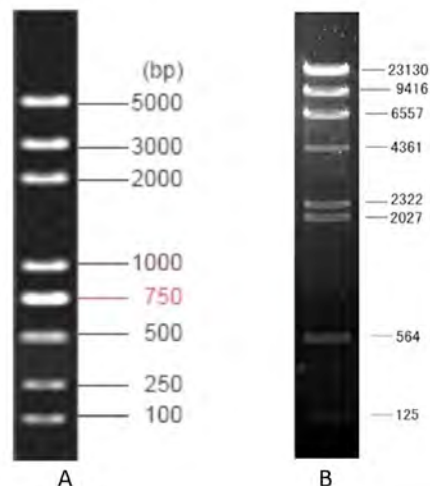


Fig. 1. (A) Trans2K™ Plus DNA Marker, (B) λ/HindIII DNA Marker, bp.

2. Exemplo de qualidade em amostras de DNA

2.1 Principais tipos de problemas encontrados em amostras de DNA

Uma amostra de DNA qualificada é comparada com amostras desclassificadas pelo controle de qualidade (Fig. 2):

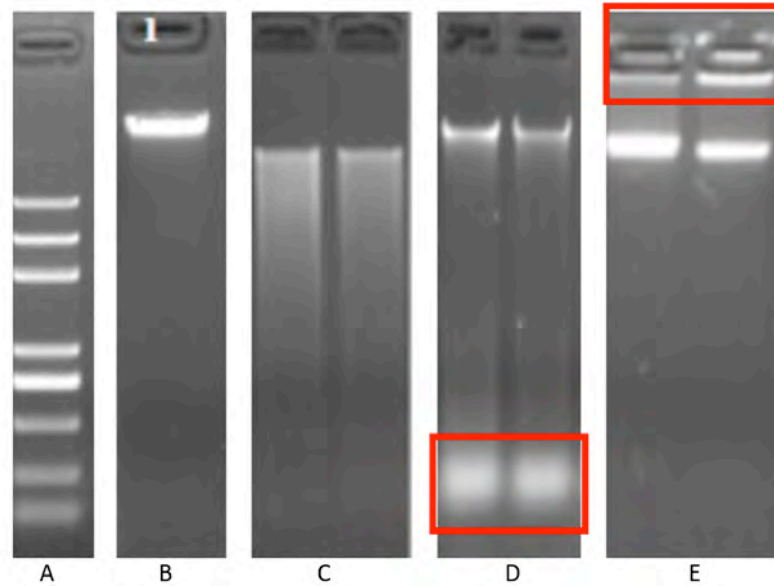


Fig. 2. Exemplos de qualidade de DNA. (A) Trans2K™ Plus DNA Marker, (B) **amostra qualificada**, (C) amostra degradada, (D) amostra contaminada com RNA, (E) amostra contaminada com proteína. As caixas em vermelho indicam as regiões de contaminação.

2.2 Amostra Degradadas

A imagem a seguir ilustra um gel com amostras degradadas. A degradação severa pode ter impacto na qualidade da biblioteca preparada e subsequente análise bioinformática (Fig. 3):

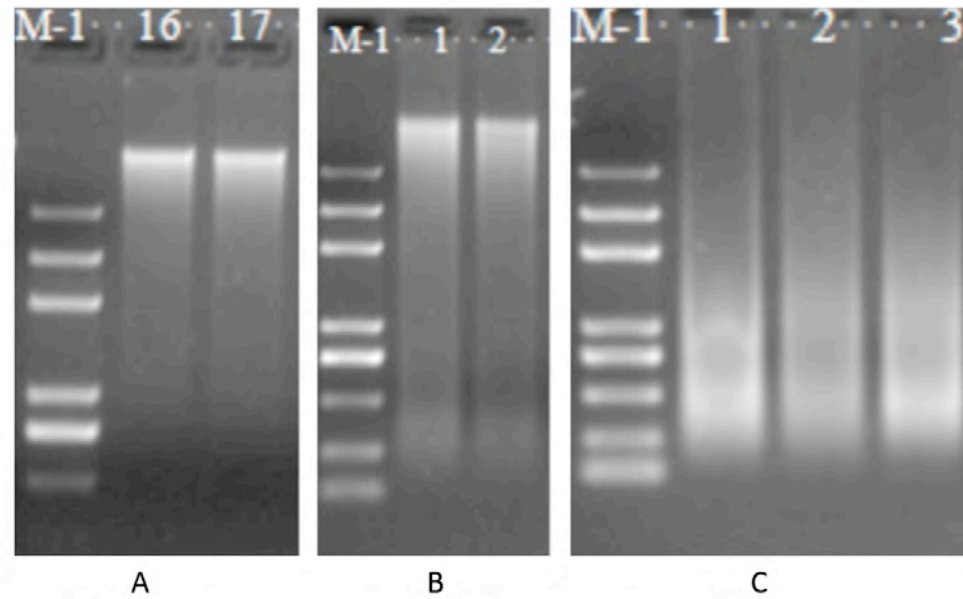


Fig. 3. Amostras de DNA degradadas. Painéis A, B, e C demonstram os níveis crescentes de degradação do DNA. M-1, Trans2K™ Plus DNA Marker.

2.3 Amostras com contaminação de RNA

A contaminação de amostras de DNA com RNA (Fig. 4) pode impedir o processo de construção das bibliotecas. É altamente recomendável digerir suas amostras de DNA com RNase antes do envio.

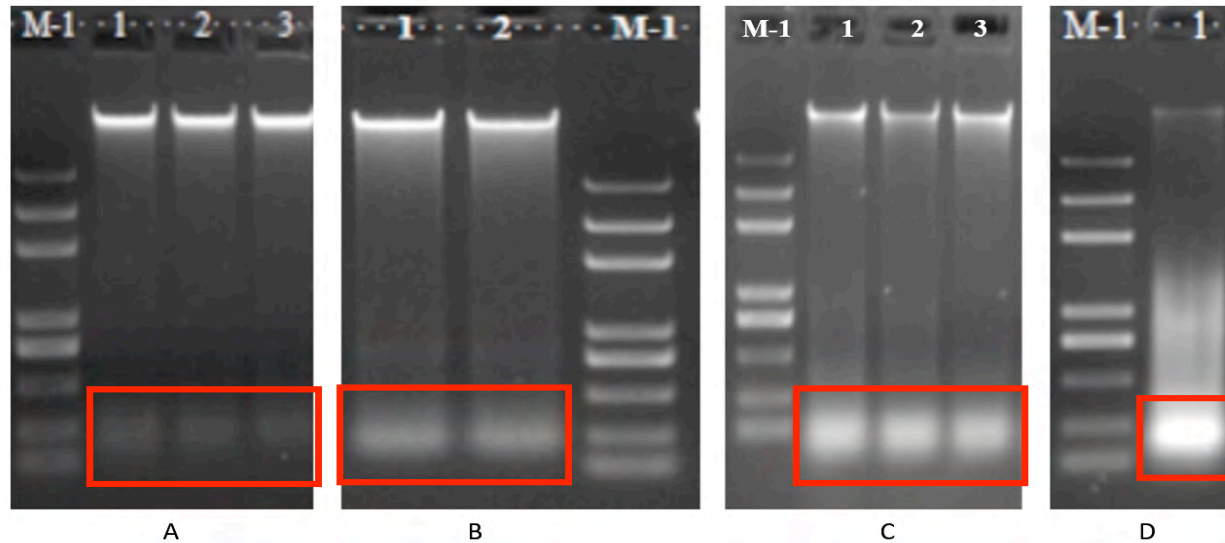


Fig. 4. Amostras de DNA contaminadas com RNA. Panéis A – D demonstram níveis crescentes de contaminação com RNA. As caixas em vermelho mostram a região referente a contaminação. M-1, Trans2K™ Plus DNA Marker.

2.4 Amostras contaminadas com proteínas

As amostras de DNA podem ser contaminada por proteínas, como ilustrado na Fig. 5. Recomenda-se a purificação das amostras de DNA contaminadas com proteínas em colunas de afinidade. Lembre que a purificação em coluna irá levar a alguma perda de DNA.

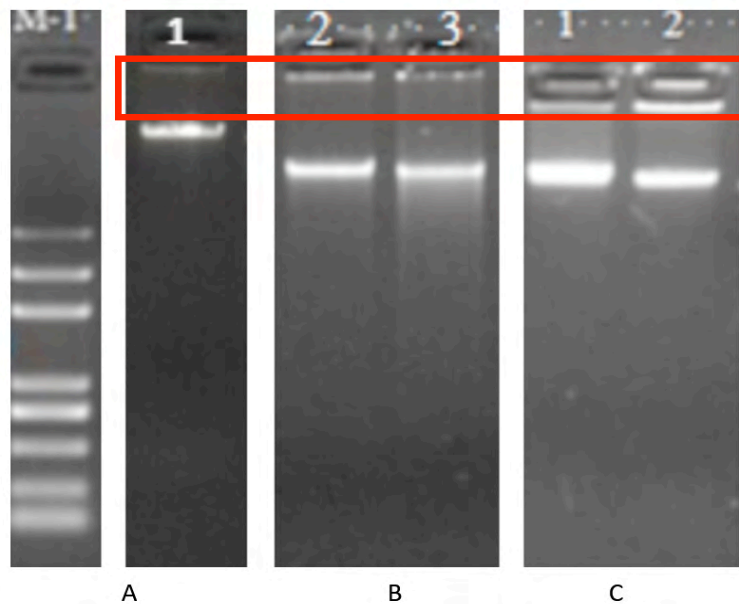


Fig. 5. Amostras de DNA contaminadas com proteínas. A – C demonstram níveis crescentes de contaminação com proteínas. Caixas em vermelho mostram as regiões referentes à contaminação. M-1, Trans2K™ Plus DNA Marker.

3. Exemplos de qualidade de amostras de RNA

3.1 Principais tipos de problemas encontrados em amostras de RNA

Uma amostra de RNA qualificada é comparada com outras desqualificadas pelo nosso QC (Fig. 6):

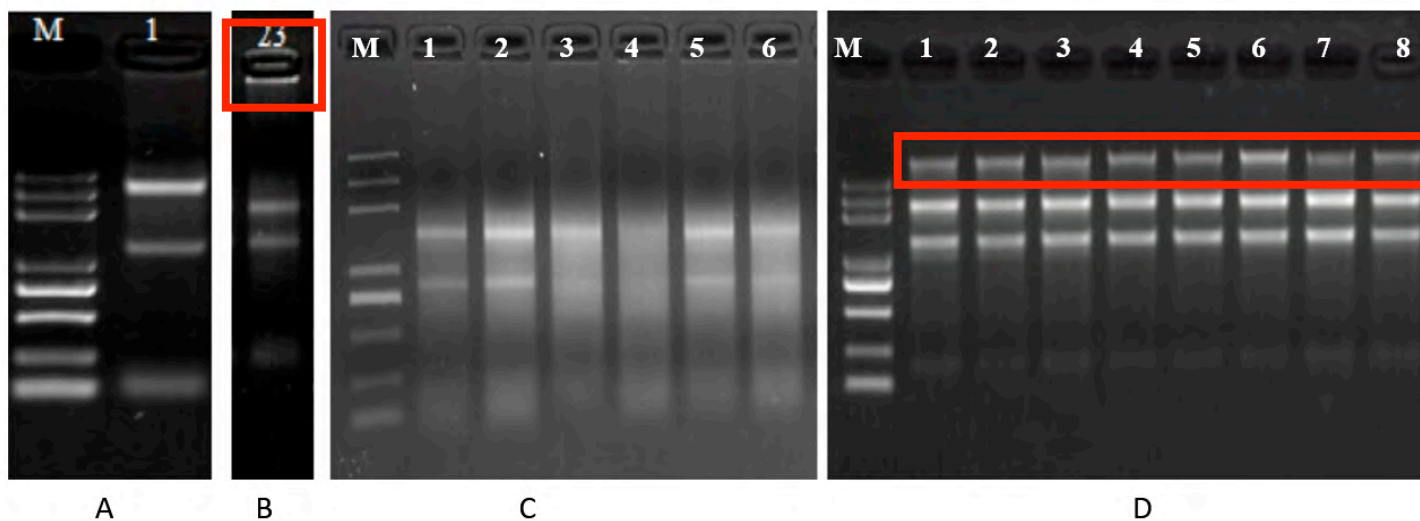


Fig. 6. Exemplos da qualidade de amostras de RNA. (A) amostra qualificada, (B) amostra com contaminação de proteínas, (C) amostras com degradação, (D) amostras com contaminação de DNA genômico. Caixas em vermelho mostram as regiões referentes à contaminação.

M, Trans2K™ Plus DNA Marker.

3.2 Amostras com contaminação de proteínas

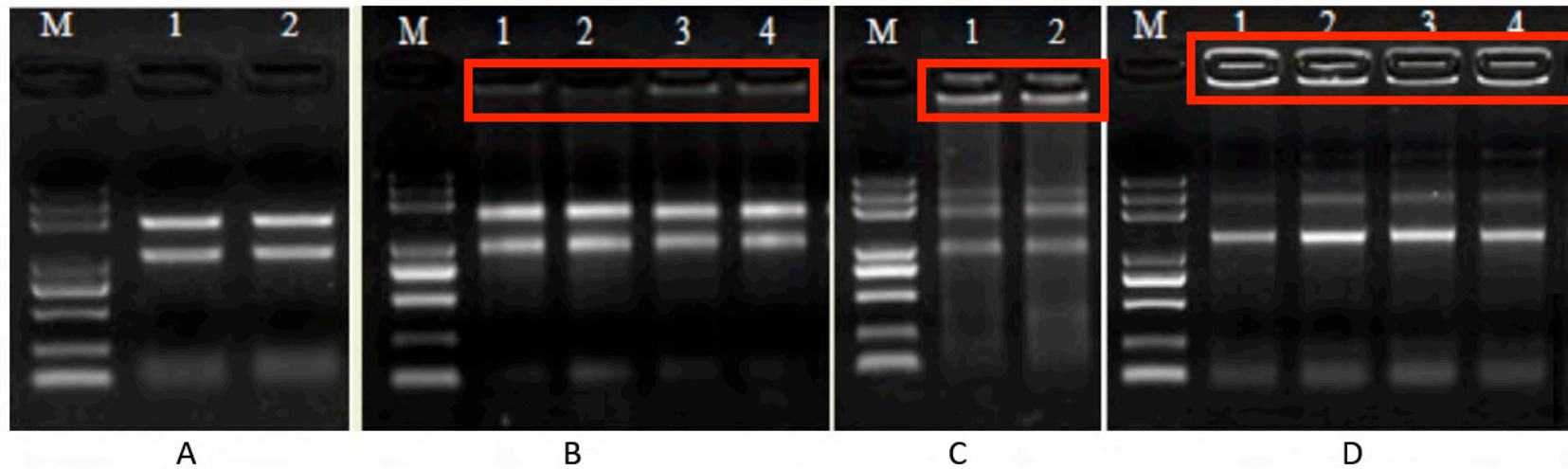


Fig. 7. Amostras de RNA com contaminações de proteínas. Panéis A – D demonstram níveis crescentes de contaminação por proteínas. Caixas em vermelho mostram as regiões referentes à contaminação.

M, Trans2K™ Plus DNA Marker..

3.3 Análise de Amostras de RNA por Gel de Agarose e Agilent 2100 Bioanalyzer



Fig. 8. Um exemplo de eletroforese em gel (à esquerda), e Agilent 2100 (direita), resultado de uma amostra de RNA total aceitável.

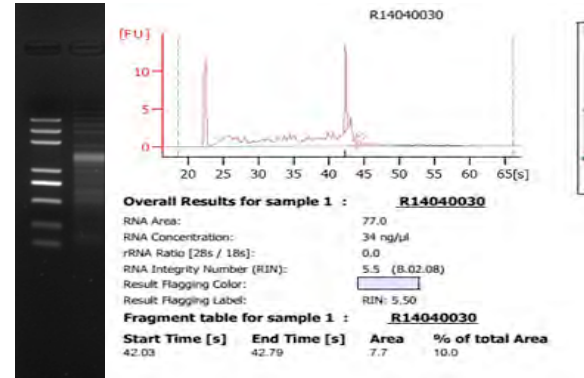


Fig. 9. Um exemplo de eletroforese em gel (à esquerda), e Agilent 2100 (direita), resultado de uma amostra de RNA total degradada.

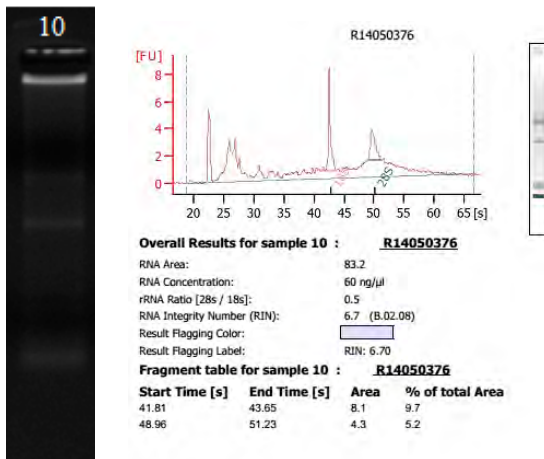


Fig. 10. Um exemplo de eletroforese em gel (à esquerda), e Agilent 2100 (direita), resultado de uma amostra de RNA contaminada.

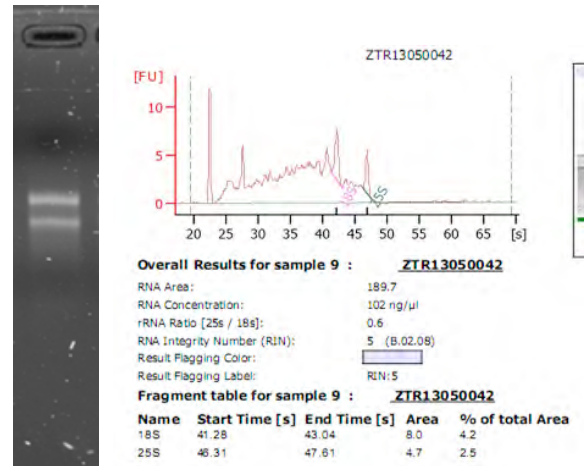


Fig. 11. Um exemplo de eletroforese em gel (à esquerda), e Agilent 2100 (direita), resultado de uma amostra de RNA total de alta viscosidade.

IV. Recomendação para Identificação das Amostras

1. É importante evitar que a marcação das amostras não seja dissolvida por solventes ou desprendam dos tubos. O uso de caneta à prova d'água para escrever diretamente na parede do tubo ou tampa é fortemente recomendado. Também é recomendado que escreva a informação da amostra em uma etiqueta de papel / plástico e cole na parede do tubo prendendo com fita adesiva (por exemplo, fita durex) clara, completamente ao redor do tubo.
2. Por favor, preencha o formulário e anexe as informações das amostras por e-mail antes do envio das amostras. Por favor, certifique-se de que a informação da amostra no Formulário de Informações coincida com a identificação dos tubos.

V. Recomendações de Embalagens

1. Para DNA e amostras de RNA, nós recomendamos tubos de 1,5 ml ou 2 ml com tampa de rosca elivres de DNase e RNase. Utilize Parafilm para selar cada tubo, antes da embalagem. Não recomendamos o transporte de amostras em solventes orgânicos (tais como etanol absoluto ou isopropanol), porque os solventes podem vazar, o que pode resultar em contaminação cruzada entre as amostras. Se for inevitável o uso de solventes orgânicos, utilize tubos com tampa de rosca e sele a tampa do tubo com pelo menos 10 camadas de Parafilm.
2. A fim de evitar o esmagamento durante o transporte, recomendamos colocar os tubos de amostra num recipiente tal como um tubo de 50 ml, ou uma caixa com suportes interiores. Algodão e artigos absorventes pode ser utilizado para prevenir a tubos de mover-se em torno de dentro do recipiente. O uso de plástico bolha em diversas camadas também é uma boa opção.
3. As amostras de RNA em solução devem ser mantidas em gelo seco durante o transporte. Amostras de DNA genômico deve ser mantido em gelo reciclável durante o transporte. Amostras de saliva deve ser enviada à temperatura ambiente.
4. Tubos Gentegra são recomendados para o envio de amostras de DNA ou RNA à temperatura ambiente, tubos Biomatrix também são aceitos.
5. A fim de ficar com os nossos padrões de controle de alta qualidade, placas de 96 poços e tubos de PCR em strips não são aceitáveis. O único recipiente que aceitaremos as amostras serão tubos de 1,5 ml ou 2 ml tubo. (Veja imagem abaixo).



Fig. 12. Tubos recomendados e proibidos.

VI. Informação das amostras

Antes de realizar o envio das amostras é necessário enviar o formulário preenchido com as informações do projeto, contratante e descrição das amostras. Precisamos avaliar a quantidade das amostras, pureza, concentração e imagens da eletroforese em gel ou bionalyzer. Solicite o seu formulário ou entre em contato com o suporte técnico.