

ORIENTAÇÕES RÁPIDAS P/ PARA MONTAGEM DE PLACA PARA PCR

Obs.: Estas são breves orientações para indivíduos que já tenham estudado o POP completo para esta operação. Em caso de dúvidas, consulte o POP detalhado.

PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO PARA EXECUÇÃO

- Serão necessárias uma pipeta de 0,1-10 µl e ponteiras adequadas para ela;
- Filme para vedação da placa;
- Dispositivo para vedar a placa com o filme;

COLOCANDO AS AMOSTRAS NA PLACA

- 1- Homogeneizar as amostras no vortex por 5 s;
- 2- Fazer descer as gotas da tampa dos eppendorfs fazendo um movimento vigoroso. Evite centrifugar nesse momento.
- 3- Pipetar **5 µl** das amostras conforme indicado na figura 1. Realizar **rigorosamente** a identificação do que contém em cada poço;
- 4- Retirar do freezer vertical a alíquota de plasmídeo com 2×10^3 n^{os} de cópias;
- 5- Em temperatura ambiente, homogeneizar no vortex;
- 6- Fazer descer as gotas da tampa dos eppendorfs fazendo um movimento vigoroso. Evite centrifugar nesse momento.
- 7- Pipetar **5 µl** nos poços do controle positivo (CP) (Figura 1);

Figura 1: Disposição das amostras e controles na placa. Exemplo para quando houverem 6 amostras e 2 controles.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	CN	CP
B	A1	A2	A3	A4	A5	A6	CN	CP
C	A1	A2	A3	A4	A5	A6	CN	
D								
E								
F								
G								

A: Amostra; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo

- 8- Vedar a placa com filme especial e usar dispositivo para selar a placa. Tomar cuidado para evitar a geração de bolhas no filme;
- 9- Colocar a placa num suporte para centrifugação e centrifugar a 800g por 1min a 22 °C.
- 10- Levar a placa para o termociclador.

Higienizar a bancada, racks, caixas de ponteiras e pipetas após esse procedimento.