



PROTOCOLO PARA NGS

COM CONJUNTO CUSTOMIZADO DE PRIMERS DESENHADO
PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA

EXECUTADO POR THÁSSIA MAYRA TELLES CARRATTO (USP), SOB
ORIENTAÇÃO DO PROF. DR. CELSO TEIXEIRA MENDES JUNIOR
(USP)

DESENVOLVIDO E ADAPTADO POR PARCEIROS DA UNIVERSIDADE KING'S COLLEGE
LONDON



1. Marcadores utilizados

- Ancestralidade:
 - 34 marcadores que compõem o sistema 34-Plex
 - 27 marcadores que compõem o sistema PIMA
- Fenotipagem
 - 41 marcadores do sistema HirisPlex-S para predição da cor da pele
 - 51 marcadores customizados para predição da cor dos olhos, cabelos e pele (desenvolvido em parceria entre USP, Universidade de Santiago de Compostela e King's College London)
- **Número total de marcadores utilizados = 148**

2. Pré-protocolo

- Extração de DNA
- Preparação dos primers (adição de água) e mix de primers a 3 µM

3. Sequência

1º passo. PCR para amplificação das regiões de interesse

Materiais

- Kit de PCR – QIAGEN Multiplex PCR Kit (<https://www.qiagen.com/br/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/pcr-enzymes-and-kits/end-point-pcr/qiagen-multiplex-pcr-kit?catno=206143>)
- Tubos ou placa para PCR

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra
QIAGEN Multiplex PCR MasterMix	5 µL
Primer mix (preparado no pré-protocolo)	1 µL
RNase-Free Water	3 µL
DNA extraído	1 µL
Total	10 µL

2º passo. Quantificação do DNA

Materiais

- Fluorímetro digital
- Kit do fluorímetro
- Tubos do fluorímetro

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra
Reagente do fluorímetro	1 µL
Solução tampão	199 µL

Mix dos reagentes anteriores	199 µL
DNA extraído	1 µL
Total	200 µL

3º passo. NEBNext End Prep

Materiais

- NEBNext[→] Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina[→] – cat. # E7645L para 96 reações (<https://www.neb.com/en/products/e7645-nebnext-ultra-ii-dna-library-prep-kit-for-illumina#>)
- Para o protocolo do kit (conforme website) – materiais requeridos, mas não fornecidos:
 - Etanol 80% recém-preparado
 - Água nuclease-free
 - 0.1X TE (1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)
 - Microtubos de baixa retenção
 - Microtubos nuclease-free
 - Termociclador
 - NEBNext[→] Multiplex Oligos for Illumina[→] - cat. # E6444S para 96 reações
 - **AMPure® XP Beads** (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
 - Raque ou placa magnética (ex., NEBNext® Magnetic Separation Rack – cat. # S1515S, Alpaqua® 96S Super Magnet Plate – cat. # A001322, ou equivalente)
- Opcionais (para ligação do adaptador em amostras de DNA ≤ 100 ng):
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 or
 - Tris/NaCl, pH 8.0 (10 mM Tris, 10 mM NaCl)

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra	
	Meia reação	Uma reação
NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix	1,5 µL	3 µL
NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer	3,5 µL	7 µL
DNA fragmentado	25 µL	50 µL
Total	30 µL	60 µL

4º passo. Ligação dos adaptadores

Materiais

- NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® – cat. # E7645L para 96 reações (<https://www.neb.com/en/products/e7645-nebnext-ultra-ii-dna-library-prep-kit-for-illumina#>)
- NEBNext[→] Multiplex Oligos for Illumina[→] (adaptadores) - cat. # E6444S para 96 reações

(<https://www.neb.com/en/products/nebnext-multiplex-oligos-for-illumina-96-unique-dual-index-primer-pairs-set-3>)

Protocolo

- Diluir adaptadores em 10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,0 com 10 mM NaCl
 - Diluição 1:10 (conforme protocolo do fabricante), ou
 - Diluição 1:50 (conforme protocolo *King's College*)

Reagente	Kit que o contém	Quantidade por amostra	
		Meia reação	Uma reação
Mistura do passo 3	-	30 µL	60 µL
NEBNext Adaptor for Illumina	E6444S	1,25 µL	2,5 µL
NEBNext Ultra II Ligation Master Mix	E7645L	15 µL	30 µL
NEBNext Ligation Enhancer	E7645L	0,5 µL	1,0 µL
USER Enzyme	E6444S	1,5 µL	3,0 µL
Total		48,25 µL	96,5 µL

5º passo. Purificação

Materiais

- **AMPure® XP Beads** (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
(<https://www.mybeckman.com.br/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr>)
- Placa magnética e strips

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra	
	Meia reação*	Uma reação**
AMPure XP Beads	38,6 µL	87 µL
Mistura do passo 4	48,25 µL	96,5 µL
Etanol para lavagem	-	-
10mM Tris-HCl ou TE	10 µL	17 µL

(*) Protocolo *King's College* (colocar 80% do volume da solução do passo 4 em beads)

(**) Protocolo do fabricante (colocar 90% do volume da solução do passo 4 em beads)

6º passo. Enriquecimento

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra	
	Meia reação	Uma reação
Adaptor Ligated DNA Fragments (passo 5)	7,5 µL	15 µL
NEBNext Ultra II Q5 MasterMix (kit E7645)	12,5 µL	25 µL
Unique Dual Index Primer Mix Set 3 (kit E6444)	5 µL	10 µL
Total	25 µL	50 µL

7º Passo – Purificação

Materiais

- **AMPure® XP Beads** (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
(<https://www.mybeckman.com.br/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr>)
- Placa magnética e strips

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra	
	Meia reação*	Uma reação**
AMPure XP Beads	25 µL	45 µL
Mistura do passo 6	25 µL	50 µL
Etanol para lavagem	-	-
10mM Tris-HCl ou TE	33 µL	33 µL

(*) Protocolo King's College (colocar 100% do volume da solução do passo 6 em beads)

(**) Protocolo do fabricante (colocar 90% do volume da solução do passo 6 em beads)

- Vortex para homogeneizar.

8º Passo – Quantificação

Materiais

- Fluorímetro digital
- Kit do fluorímetro
- Tubos do fluorímetro

Protocolo

Reagente	Quantidade por amostra
Reagente do fluorímetro	1 µL
Solução tampão	199 µL
Mix dos reagentes anteriores	199 µL
DNA extraído	1 µL
Total	200 µL

9º passo. Preparação do pool e sequenciamento

Materiais

- Amostras do passo 7
- Reagente Verogen MiSeq FGx Reagent Micro Kit (20021681)
(<https://www.qiagen.com/us/products/human-id-and-forensics/nextgeneration-sequencing/verogen-miseq-fgx-sequencing-reagents?catno=20021681>)

Protocolo

- Seguir recomendações do fabricante