

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Bacharelado em Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia Molecular

Renata Ott Oliveira

**AUTOMAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PARA
SEQUENCIAMENTO CAPILAR**

Porto Alegre

2022

Renata Ott Oliveira

**AUTOMAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PARA
SEQUENCIAMENTO CAPILAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharela em
Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia
Molecular do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Giancarlo Pasquali.

Porto Alegre

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Renata
AUTOMAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PARA
SEQUENCIAMENTO CAPILAR / Renata Oliveira. -- 2022.
31 f.
Orientador: Giancarlo Pasquali.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Sequenciamento de DNA. 2. Preparo automatizado
de amostras. 3. Robôs de pipetagem. 4. Sequenciador de
DNA. I. Pasquali, Giancarlo, orient. II. Título.

Renata Ott Oliveira

**AUTOMAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PARA
SEQUENCIAMENTO CAPILAR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharela em
Biotecnologia - Ênfase em Biotecnologia
Molecular do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Orientador: Giancarlo Pasquali.

Aprovada em:Porto Alegre, 27 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Giancarlo Pasquali
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Lívia Kmetzsch Rosa e Silva
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Tarso Benigno Ledur Kist
Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que
minha família me deu durante toda a minha
existência, dedico esta monografia a eles.

Gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Fabiana Ott Oliveira e Cesar Augusto dos Santos Oliveira, ao meu irmão João Felipe Ott Oliveira e meu marido João Victor Toledo pelo companheirismo, pela cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus dindos Ricardo Ott, Luana Antonello e Vinícius Borba que sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Prof. Giancarlo Pasquali, por todos os ensinamentos e orientações para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha professora de biologia Tatiana Geraldino por todos os conselhos e ajuda, apoiando-me e me incentivando na escolha da carreira.

Ao Cleber Pereira por acreditar em mim e me incentivar a continuar seguindo os meus sonhos.

A todos os meus amigos e alunos por toda colaboração, apoio e momentos de descontração.

À empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. pelo apoio e empréstimo de equipamentos e materiais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar um ambiente acadêmico de qualidade.

“Oportunidades não caem do céu, elas são conquistadas por quem não nasceu com alma vitimista.”

Maryanne Schramm

RESUMO

O sequenciamento de DNA iniciou-se na década de 1970, com os métodos de degradação química e terminação de cadeia com didesoxirribonucleotídeos segundo, Frederick Sanger. As tecnologias de sequenciamento de DNA são ferramentas poderosas que enriquecem as ciências moleculares desde o passado e continuam a apresentar cada vez mais inovações com base no sequenciamento de última geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* ou NGS). Atualmente, o método de Sanger ainda é utilizado, porém sem escalabilidade, bastante trabalhoso e demorado, comparado com as metodologias NGS que podem proporcionar o sequenciamento direto e paralelo de milhões e bilhões de moléculas de DNA, aumentando a escala e a resolução das análises. Ainda assim, o sequenciamento por eletroforese capilar (EC, do inglês, *capillary electrophoresis* ou CE) baseada em Sanger ainda representa metodologia de fundamental importância à comunidade científica e de atenção à saúde ao permitir o processamento de algumas poucas amostras de DNA resultando em leituras longas de alta fidelidade, acurácia e relativa rapidez. Com o intuito de proporcionar maior agilidade para o processo de sequenciamento por CE com o sequenciador AB-3500 (Applied Biosystems), um estudo para a (semi-)automação do preparo de amostras para o sequenciamento de DNA foi realizado. O estudo foi inicialmente feito com o equipamento *Ion Chef* da empresa Thermo Fisher que se encontra presente no Centro de Biotecnologia e, a seguir, com outros robôs de pipetagem, a fim de encontrar a melhor opção para agilizar o processo de pipetagens do protocolo para o sequenciador AB-3500.

Palavras-chave: Sequenciamento de DNA. Preparo automatizado de amostras. Robôs de pipetagem. Sequenciador de DNA.

ABSTRACT

DNA sequencing started in the 1970s with the methods of chemical degradation and chain termination with dideoxynucleotides according to Frederick Sanger. DNA sequencing technologies are powerful tools that have enriched the molecular sciences since the past and continue to present more and more innovations based on Next Generation Sequencing (NGS). Currently, the Sanger method is still used, but it is scaleless, labor-intensive, and time-consuming compared to NGS methodologies that can provide direct and parallel sequencing of millions and billions of DNA molecules, increasing the scale and resolution of analyses. Still, Sanger-based capillary electrophoresis (CE) sequencing still represents a methodology of fundamental importance to the scientific and health care community by allowing the processing of a few DNA samples resulting in long reads of high fidelity, accuracy, and relative speed. Aiming to provide greater agility to the process of sequencing by EC with the sequencer AB-3500 (Applied Biosystems), a study for the (semi-) automation of sample preparation for DNA sequencing was performed. The study was initially done with the Ion Chef equipment from Thermo Fisher company that is present in the Biotechnology Center and, then, with other pipetting robots, in order to find the best option to streamline the process of protocol pipetting for the AB-3500 sequencer.

Keywords: DNA sequencing. Automated sample preparation. Pipetting robots. DNA Sequencer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ilustração do método de sequenciamento de Sanger. Este método consiste em identificar, continuamente e sequencialmente durante o processo, o último nucleotídeo incorporado na extremidade de alongamento da cadeia. O processo é realizado a partir de uma cadeia simples (não dupla) do DNA a ser sequenciado; esta servirá de molde para gerar a outra fita (complementar) da dupla hélice. Isto é obtido pela desnaturação da molécula nativa.....	12
Figura 2- Sequenciadores automáticos baseados em eletroforese capilar.....	14
Figura 3- <i>Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer</i>	14
Figura 4- Sistemas de sequenciamento <i>Ion S5</i> e <i>Ion Chef</i>	16
Figura 5- Componentes presentes no <i>Ion Chef System</i>	23
Figura 6- Componentes presentes no <i>Ion Chef System</i>	24
Figura-7. <i>Andrew+ - The Pipetting Robot (WATERS)</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
bp	<i>Base pairs</i>
CBiot	Centro de Biotecnologia
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CE	<i>Capillary-based Electrophoresis</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EC	Eletroforese Capilar
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FAURGS	Fundação de Apoio da UFRGS
Genolyptus	Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de <i>Eucalyptus</i>
IECBiot	Incubadora Empresarial do Centro de Biotecnologia
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIGS	Projeto Integrado de Genomas Sul
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	A ERA “PÓS-GENÔMICA”	11
1.2	O LEGADO DE FREDERICK SANGER	11
1.3	PRIMEIROS SEQUENCIADORES AUTOMÁTICOS	13
1.4	O SEQUENCIADOR <i>AB-3500 GENETIC ANALYZER</i>	14
1.5	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO OU ÚLTIMA GERAÇÃO ...	15
1.6	EQUIPAMENTOS DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS	16
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVO GERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.2.1	Objetivo Específico 1	18
3.2.2	Objetivo Específico 2	18
3.2.3	Objetivo Específico 3	19
3.2.4	Objetivo Específico 4	19
4	MATERIAIS, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO	19
4.1	ETAPAS DE MARCAÇÃO E SEQUENCIAMENTO EM SEQUENCIADOR AB-3500	19
4.2	<i>ION CHEF</i> – OPERAÇÕES BÁSICAS	20
4.3	REAVLIAÇÃO DO PROTOCOLO DAS ETAPAS DE MARCAÇÃO E SEQUENCIAMENTO EM SEQUENCIADOR AB-3500 COM O USO DO <i>ION CHEF</i> <i>SYSTEM</i>	23
4.4	ALTERNATIVAS E BUSCA POR OUTROS ROBÔS DE PIPETAGEM ..	25
4.5	<i>ANDREW – THE PIPETTING ROBOT</i>	27
5	CONCLUSÃO	29
5.1	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS	29
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ERA “PÓS-GENÔMICA”

O sequenciamento de DNA é o processo realizado para se determinar a sequência exata de nucleotídeos em uma molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN ou, do inglês, *deoxyribonucleic acid* ou DNA). Ao sequenciar um fragmento de DNA, será possível conhecer a sequência em que as quatro bases nucleotídicas (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) ocorrem dentro dessa molécula de ácido nucleico. A sequência nucleotídica é a base para o conhecimento de um gene ou genoma. Ela contém as informações sobre as propriedades hereditárias e bioquímicas da vida (BEHJATI, 2013).

Com base nos avanços dos estudos, e a criação do Projeto Genoma Humano, um dos mais amplos consórcios de sequenciamento de DNA já existentes, envolvendo centenas de pesquisadores de dezenas de instituições e com dezenas de sequenciadores automáticos de DNA baseados na eletroforese capilar, novas tecnologias de sequenciamento do material genético foram desenvolvidas, levando ao surgimento da era conhecida como “Pós-genômica”, superando todo o processo de sequenciamento manual ou por eletroforese capilar em um único dia de trabalho, por um único pesquisador, utilizando um único sequenciador de última geração. Os últimos 100 anos testemunharam uma verdadeira revolução no entendimento de como a informação genética é armazenada, usada e transmitida (GREEN, 2015).

1.2 O LEGADO DE FREDERICK SANGER

O método de sequenciamento de DNA mais fundamental ao desenvolvimento de muitas tecnologias utilizadas até os dias de hoje foi o desenvolvido por Frederick Sanger, também chamado de método dos didesoxirribonucleotídeos ou método de terminação de cadeia (Figura 1). O método Sanger de sequenciamento de DNA revela sequências de alta qualidade para trechos relativamente longos de DNA, atingindo mais de 900 pares de base (pb ou, do inglês, *base pairs* ou bp). É tipicamente usado para sequenciar fragmentos individuais de DNA ligados a

plasmídeos bacterianos ou resultantes da amplificação pela técnica da reação em cadeia da DNA-polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction* ou PCR).

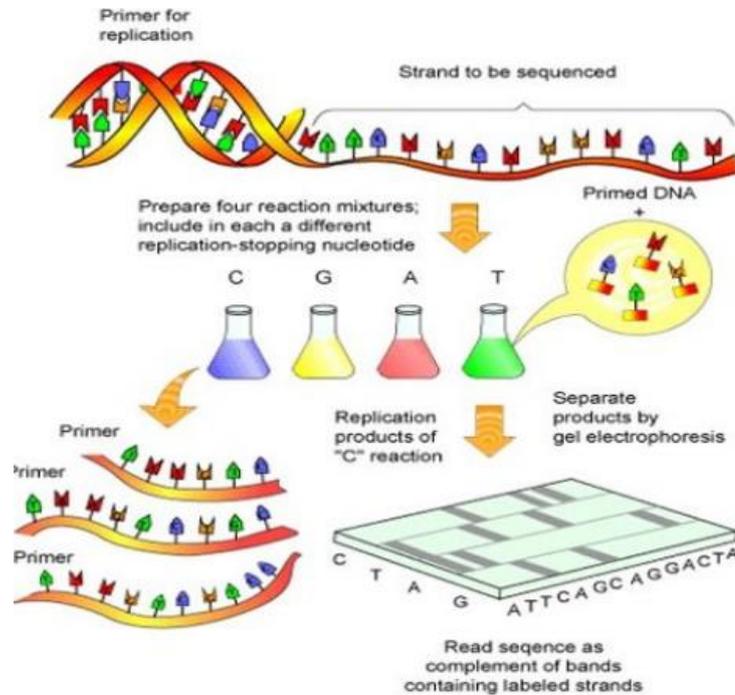


Figura 1. Ilustração do método de sequenciamento de Sanger. Este método consiste em identificar, continuamente e sequencialmente durante o processo, o último nucleotídeo incorporado na extremidade de alongamento da cadeia. O processo é realizado a partir de uma cadeia simples (não dupla) do DNA a ser sequenciado; esta servirá de molde para gerar a outra fita (complementar) da dupla hélice. Isto é obtido pela desnaturação da molécula nativa.

Entretanto, o método Sanger de sequenciamento é caro e ineficiente para projetos de larga escala como o sequenciamento de genomas inteiros ou metagenomas, sendo necessárias técnicas mais modernas e rápidas de sequenciamento. A partir de estudos e avanços técnicos, foi possível a automatização do sequenciamento, trazendo melhorias para o método de Sanger, como a criação dos primeiros sequenciadores automáticos de DNA baseados na Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (*PAGE*, do inglês, *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) (BECK, 2016).

1.3 PRIMEIROS SEQUENCIADORES AUTOMÁTICOS

A PAGE é uma técnica de separação de moléculas de DNA em uma malha molecular de poliacrilamida de acordo com o comprimento e carga das moléculas. As amostras de DNA são pipetadas em poços localizados em uma das extremidades de um gel de poliacrilamida e um campo elétrico é aplicado, pela diferença de potencial elétrico entre os eletrodos, onde ocorrerá a separação. Todos os fragmentos de DNA possuem a mesma quantidade de carga negativa por unidade de comprimento em pH neutro, fazendo com que os fragmentos menores atravessem o gel mais rapidamente em direção ao ânodo (SWERDLOW, 1990). Os primeiros sequenciadores automáticos de DNA utilizavam PAGE para a separação dos fragmentos de DNA marcados para a determinação de seus tamanhos e, por conseguinte, as sequências nucleotídica. Entre estes primeiros sequenciadores baseados em PAGE cabe destacar os modelos *ABI PRISM 310 e 377 Genetic Sequencers* (Applied Biosystems) e *ALF DNA Analysis System* (Pharmacia) (HEATHER & BENJAMIN, 2016).

Avançando mais o tempo e os estudos no método de terminação de cadeia, os métodos de sequenciamento também avançaram, fazendo com que fossem criados sequenciadores automáticos baseados em eletroforese capilar (EC, do inglês, CE ou *capillary-based electrophoresis*; Figura 2), onde um longo capilar é preenchido com matriz de separação como, por exemplo, poliacrilamida linear. As extremidades dos capilares permanecem mergulhadas em recipientes contendo uma solução de eletroforese à base de Tris/EDTA/ácido bórico ou acético. Um campo elétrico é criado entre as extremidades, gerando corrente no interior de cada capilar. Amostras de DNA são “injetadas” na extremidade do cátodo. O campo elétrico provoca o movimento dos analitos em direção ao eletrodo de carga contrária (ânodo). Assim como o sequenciador baseado em PAGE, os analitos também são separados conforme sua carga e tamanho, passando por uma janela de excitação de fluorescência, gerando um eletroferograma (DOLNIK, 1999). Entre os mais populares sequenciadores automáticos de DNA baseados em EC cabe salientar os modelos MEGA-Bace 1000 (GE Healthcare) e ABI-3700 (Applied Biosystems), ambos tipicamente armados com 96 capilares para o sequenciamento simultâneo de 96 amostras de DNA distribuídas em microplacas do tipo ELISA.

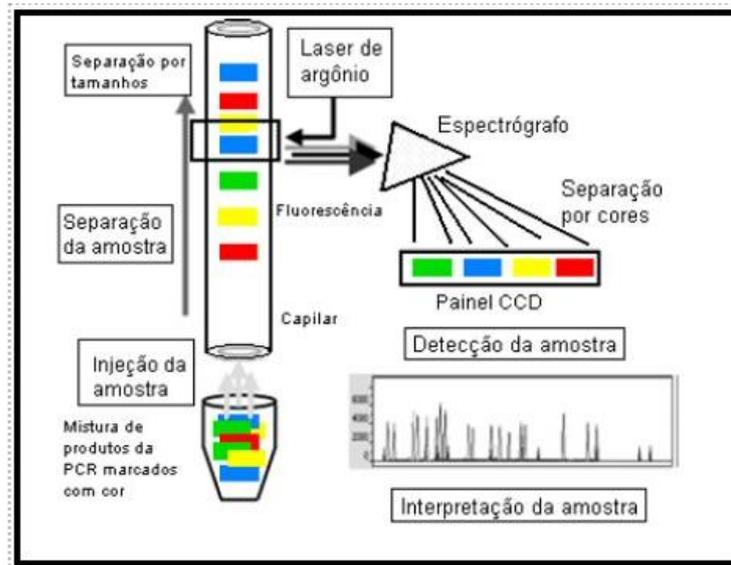


Figura 2. Sequenciadores automáticos baseados em eletroforese capilar.

1.4 O SEQUENCIADOR AB-3500 GENETIC ANALYZER

Em 2016, a empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda., incubada na Incubadora Empresarial do CBIot, adquiriu um novo sequenciador por eletroforese capilar, o *AB-3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, no Brasil representada pela Thermo Fisher) (Figura 3). Este equipamento opera com oito capilares e resolve por eletroforese capilar em 30 h as seqüências de 192 amostras de DNA distribuídas em duas microplacas do tipo “ELISA” de 96 poços cada (Applied Biosystems, 2010).



Figura 3. *Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer.*

O AB-3500 opera diariamente e de forma quase ininterrupta. A preparação de amostras é quase inteiramente manual. Isto demanda muita prática em pipetagens e outras técnicas e tempo relativamente longo para execução. O AB-3500 é ideal para o sequenciamento de algumas poucas amostras de DNA (8 a 96 amostras por corrida). Portanto, seria altamente desejável a otimização deste preparo de amostras por meio de sua automatização ou semiautomatização. A disponibilidade do preparador de amostras robotizado *IonChef* no CBIOT e a busca por outros preparadores de amostras e robôs de pipetagem é oportunidade para otimizar estes procedimentos de preparo de amostras.

1.5 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO OU ÚLTIMA GERAÇÃO

As novas tecnologias de sequenciamento de DNA são denominadas “*deep sequencing*”, “*next-generation sequencing*” (NGS), sequenciamento massivo ou de alta eficiência. Com aplicações muito mais amplas do que o simples sequenciamento de cromossomos, as tecnologias NGS permitem acessar a expressão gênica dos organismos pelo sequenciamento e estimativa do número de cópias de transcritos de cada gene, detectar milhares de mutações em genomas, com aplicações na área de diagnóstico, descobrir novas sequências codificadoras de proteínas de inúmeros organismos simultaneamente, pela denominada metagenômica, identificar centenas de sequências de pequenos RNAs interferentes, os quais determinam padrões significativos de regulação da expressão gênica; entre outras aplicações, é possível realizar o sequenciamento de um genoma inteiro em questão de dias. A sua velocidade, capacidade de gerar dados em larga escala e precisão, a um custo inferior aos métodos tradicionais ganham, a cada dia, mais espaço. Portanto, nos últimos anos, as tecnologias NGS tornaram-se ferramentas fundamentais para a análise integrada de genomas, transcritomas e de sistemas biológicos.

1.6 EQUIPAMENTOS DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS

Desde o início de projetos “genoma” no Brasil, o Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) teve intensa participação. Dois equipamentos de sequenciamento automático de DNA por eletroforese capilar e infraestrutura complementar foram instalados entre 2000 e 2002, com focos nas bactérias *Chromobacterium violaceum* (Projeto Genoma Brasileiro), *Mycoplasma* sp. (Projeto Integrado de Genomas Sul - PIGS) e nos transcritomas de espécies de eucalipto (Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus* - GENOLYPTUS). Aqueles equipamentos de sequenciamento por eletroforese capilar (*MEGA BACE 1000*, GE Healthcare; e *ABI-3100 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems) e equipamentos acessórios tornaram-se obsoletos a partir de 2015, sem assistência técnica por parte dos fabricantes ou de seus representantes no Brasil.

Em 2020, por meio do “Programa 2012 de Avanços da Pesquisa na UFRGS” resultante do Convênio UFRGS/FINEP 01.12.0524.00/FAURGS 6861/CT-INFRA XI, o CBiot recebeu um conjunto de equipamentos para o sequenciamento NGS, em especial o sequenciador *Ion S5* e o preparador de amostras *IonChef* (Thermo Fisher) (Figura 4). O *Ion S5*, em função de suas características técnicas inovadoras, é o mais eficiente e mais revolucionário *deep-sequencer*. Diferente de todos os demais *deep-sequencers* cuja atividade depende da detecção de fluorescência (luz), o *Ion S5* detecta a incorporação de nucleotídeos às cadeias crescentes de DNA a partir da variação da concentração do ânion pirofosfato. Trata-se, portanto, de um medidor potenciométrico da concentração de íons pirofosfato em nanoescala baseado em tecnologia semicondutora, permitindo o sequenciamento simultâneo de 1, 6, ou 12 milhões de segmentos de DNA (Thermo Fisher Scientific, 2015).



Figura 4. Sistemas de sequenciamento *Ion S5* e *Ion Chef*. Disponível em <https://www.biometrix.com.br/one-lambda-equipamentos/sequenciamento-ion-s5-chef/>.

2 JUSTIFICATIVA

O sequenciamento de DNA por EC é realizado intensamente no CBiot por meio da empresa incubada ACTGene Análises Moleculares Ltda. Embora o sequenciamento de DNA propriamente dito seja realizado de forma automatizada por EC pelo sequenciador *AB-3500 Genetic Analyzer*, o preparo das amostras de DNA que são submetidas para o sequenciamento é inteiramente manual, exigindo intenso trabalho e máxima atenção para a distribuição de amostras e reagentes em microplacas de 96 poços. Seria altamente desejável a otimização deste preparo de amostras por meio da automatização ou semiautomatização. A disponibilidade do preparador de amostras robotizado *IonChef* no CBiot é oportunidade para otimizar estes procedimentos de preparo de amostras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Automatizar ou semiautomatizar os procedimentos de preparo de amostras de DNA para sequenciamento por eletroforese capilar utilizando equipamentos como o *IonChef* (Thermo Fisher).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Objetivo Específico 1

Estudar, aprender e executar os procedimentos de preparação manual de amostras de DNA para o sequenciamento por eletroforese capilar no sequenciador AB-3500.

3.2.2 Objetivo Específico 2

Estudar a programação e entender o uso do Ion Chef para a preparação de bibliotecas de DNA destinadas ao sequenciamento NGS com o Ion GeneStudio S5.

3.2.3 Objetivo Específico 3

Avaliar a possibilidade de reprogramar o Ion Chef para a dispensação de amostras de DNA em microplacas de 96 poços, a adição da mistura de reação de marcação, a PCR e a purificação.

3.2.4 Objetivo Específico 4

Indicar equipamentos e métodos alternativos para a (semi-)automação do preparo de amostras.

4 MATERIAIS, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO

4.1 ETAPAS DE MARCAÇÃO E SEQUENCIAMENTO EM SEQUENCIADOR AB-3500

A partir do estudo do protocolo de preparo de amostras da empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda., incubada da IECBiot e com auxílio da biotecnologista Virgínia de Castilhos – responsável técnica da ACTGene – foi feita, então uma análise detalhada de todos os processos manuais descritos no seguinte protocolo ou procedimento operacional:

1. As amostras de DNA (30-60 ng) e *primers* (4,5 pmol) são usualmente fornecidos já misturados ao laboratório em tubos de 0,5 mL ou distribuídas em microplacas de 96 poços.
2. As amostras secas são solubilizadas em 6 µL de água ultrapura.
3. Volume de 3 µL de cada amostra é transferido para microplacas de sequenciamento.
4. Volume de 7 µL da mistura de reação de marcação é pipetado em cada amostra.
5. As microplacas são seladas e as amostras são homogeneizadas por agitação vibratória (*Vortex*) e rapidamente centrifugadas (*spin*).
6. Os adesivos são removidos e septas de borracha sintética são colocadas sobre as placas para termociclagem.
7. Termociclagem:

Desnaturação inicial: 96 °C - 3 min

	96 °C - 10 s
25 Ciclos	55 °C - 5 s
	60 °C - 4 min

Estocagem a 4 °C.

8. Volume de 50 µL de isopropanol a 75% é pipetado em cada amostra.
9. Nova homogeneização em Vortex e incubação por 20 min a -20 °C.
10. Centrifugação das microplacas a 3.700 rpm durante 40 min.
11. Inversão das microplacas sobre pia para descarte do sobrenadante seguida da secagem sobre papel absorvente.
12. As microplacas são posicionadas em evaporador rotatório (*speed-vac*) por 20 min para evaporação do álcool remanescente.
13. As amostras são diluídas em volume de 10 µL de Formamida Hi-Di.
14. As microplacas são novamente posicionadas em termociclador para desnaturação a 95 °C por 5 min e imediatamente transferidas para gelo.
15. As microplacas são montadas nos cassetes de sequenciamento (*Retainer & Base Set*) e estes são posicionados no sequenciador AB-3500 para sequenciamento.

4.2 ION CHEF – OPERAÇÕES BÁSICAS

O sistema *Ion Chef* é a próxima geração de produtos de simplificação de fluxo de trabalho. Ele fornece preparação automatizada de bibliotecas, preparação de modelos e carregamento de *chips* para usuários em qualquer nível de experiência. Em menos de 15 min de tempo prático inicial e com o uso de *kits* de reagentes de preparação de biblioteca pré-embalados, o *Ion Chef System* fornece um fluxo de trabalho prático e fácil, resultando em bibliotecas equalizadas e agrupadas prontas para modelagem (Thermo Fisher, 2015).

O *Ion Chef System* promete simplificar o fluxo de trabalho, minimizar as fontes de variabilidade introduzidas pelo usuário, ajudar a economizar tempo e trabalho. Esse sistema simplifica o fluxo de trabalho de NGS do *Ion Torrent* integrando várias etapas manuais e de instrumentos em um único processo.

Porém, ele foi originalmente configurado para trabalho com o sistema *Ion GeneStudio S5*. Uma análise do protocolo de operações básicas do *Ion Chef System* foi realizada, para avaliar a possibilidade de reprogramação do sistema para

seu uso como preparador de amostras para sequenciamento como AB-3500, automatizando ou semiautomatizando esta etapa do sequenciamento (Thermo Fischer Scientific, 2015).

- **Preparo de Moldes de DNA (*Templates*):**

- O kit “*Ion S5 Chef Solutions*” contém 4 caixas e cada caixa é utilizada para cada reação.
- O kit “*Ion S5 Chef Supplies*” contém todos os insumos plásticos.
- Os kits “*Ion 510 520 530*” contêm os reagentes e *chips* para o sequenciamento.
- Deixar o *kit ion 510 520 530* estabilizando à temperatura ambiente por pelo menos 45 min.
- Pipetar as bibliotecas na concentração recomendada pelo manual.
- Tirar as tampas dos tubos.

Inicialização do equipamento:

- Abrir a porta (pressionar botão *eject* no canto superior direito), levantar a porta e travar.
- Presionar “*set up run*”.
- “*Step by Step*”.
- “*Template*”.
- Posicionar o cartucho de soluções na primeira posição.
- “*Next*”.
- Instalar o cartucho *reagentes* com as amostras.
- “*Next*”.
- Instalar novas ponteiras, tirando o plástico de proteção.
- “*Next*”.
- Deixar a caixa de ponteiras vazias usadas na corrida anterior como descarte.
- Instalar a placa de PCR e o selante com o código de barras voltado para frente.
- “*Next*”.
- Instalar o cartucho de enriquecimento com a posição A voltada para cima.
- “*Next*”.

- Instalar os tubos *recovery* na centrífuga (completar as duas centrífugas - 12 tubos).
- Colocar a tampa na centrífuga (lado quadrado para a direita e lado redondo para a esquerda).
- Fechar a tampa superior da centrífuga.
- “Next”.

Realizar a instalação dos *chips*:

- Abrir a tampa superior da centrífuga.
- Remover um dos *buckets*.
- Retirar o *chip*.
- Verificar a posição chanfrada no lado inferior direito do chip que deve estar alinhada com a posição chanfrada do *bucket*.
- Remover o adaptador que vem no *kit “ion s5 chef supplies”*.
- Posicionar a posição superior do chip na parte de trás e pressionar a parte inferior do chip, de modo que o chip fique exposto.
- Colocar o chip com o adaptador na centrífuga.
- Se estiver trabalhando com dois chips por corrida, repetir o procedimento anterior com o outro chip.
- Olhar na centrífuga, quando os dois furos estiverem posicionados para cima, a posição A do chip será no lado esquerdo e a posição B no chip no lado direito.
- Fechar a tampa da centrífuga.
- “Next”.
- Fechar a porta do equipamento, pressionando para cima até ouvir um “click” e ir soltando a porta, pressionar as partes superiores laterais para trancar a porta.
- “Start check” (o equipamento irá verificar se foi tudo colocado corretamente).
- Quando terminar a reação no equipamento, a porta será liberada.

Retirada dos insumos:

- Abrir a porta da centrífuga e tirar cuidadosamente o chip (algum líquido pode sobrar no adaptador - remover com uma pipeta). Retirar o adaptador do chip e realizar o sequenciamento do chip ou guardar o chip na geladeira de 6 a 8 horas até realizar o sequenciamento.
- Retirar o outro chip e todos os consumíveis que foram instalados.
- Retirar as tampas das centrífugas e os tubinhos.

- Deixar a rack de ponteiros vazias para ser descartado na próxima reação.
- Fechar todas as tampas.
- Fechar a porta do equipamento.

4.3 REAVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DAS ETAPAS DE MARCAÇÃO E SEQUENCIAMENTO EM SEQUENCIADOR AB-3500 COM O USO DO *ION CHEF SYSTEM*

As conclusões tomadas a partir do estudo de todos os protocolos e itens presentes no *Ion Chef System*, foram que ele não poderia ser reprogramado, pois, foi projetado especificamente para o preparo de bibliotecas de DNA destinadas ao sequenciamento NGS no *Ion GeneStudio S5* e não é programável para pipetagens diferentes daquelas designadas para PCR em emulsão e “carregamento” de *chips* de DNA. Embora equipado com robô de pipetagem, termociclador e centrífugas, o *Ion Chef* é limitado a ponteiros de 1 mL e centrífugas de tubos e não de microplacas (Figuras 5 e 6).

Foi feita, então, uma reavaliação do protocolo de preparação de amostras para o sequenciamento no sequenciador AB-3500. Observamos que muitas das etapas continuariam sendo manuais, não tendo necessidade de utilizar o *Ion Chef* para o fim de interesse:

1. As amostras de DNA (30-60 ng) e *primers* (4,5 pmol) são usualmente fornecidos já misturados ao laboratório em tubos de 0,5 mL ou distribuídas em microplacas de 96 poços.
2. As amostras secas são solubilizadas em 6 μ L de água ultrapura.
3. Volume de 3 μ L de cada amostra é transferido para microplacas de sequenciamento.
4. Volume de 7 μ L da mistura de reação de marcação é pipetado em cada amostra.
5. As microplacas são seladas e as amostras são homogeneizadas por agitação vibratória (*Vortex*) e rapidamente centrifugadas (*spin*).

[NECESSARIAMENTE MANUAL]

6. Os adesivos são removidos e septas de borracha sintética são colocadas sobre as placas para termociclagem. **[MANUAL]**

7. Termociclagem:

Desnaturação inicial: 96 °C - 3 min

96 °C - 10 s

25 Ciclos 55 °C - 5 s

60 °C - 4 min

Estocagem a 4 °C. [MANUAL]

8. Volume de 50 µL de isopropanol a 75% é pipetado em cada amostra.
9. Nova homogeneização em Vortex e incubação por 20 min a -20 °C. [MANUAL]
10. Centrifugação das microplacas a 3.700 rpm durante 40 min. [MANUAL]
11. Inversão das microplacas sobre pia para descarte do sobrenadante seguida da secagem sobre papel absorvente. [MANUAL]
12. As microplacas são posicionadas em evaporador rotatório (*speed-vac*) por 20 min para evaporação do álcool remanescente. [MANUAL]
13. As amostras são diluídas em volume de 10 µL de Formamida Hi-Di.
14. As microplacas são novamente posicionadas em termociclador para desnaturação a 95 °C por 5 min e imediatamente transferidas para gelo. [MANUAL]
15. As microplacas são montadas nos cassetes de sequenciamento (*Retainer & Base Set*) e estes são posicionados no sequenciador AB-3500 para sequenciamento. [MANUAL]

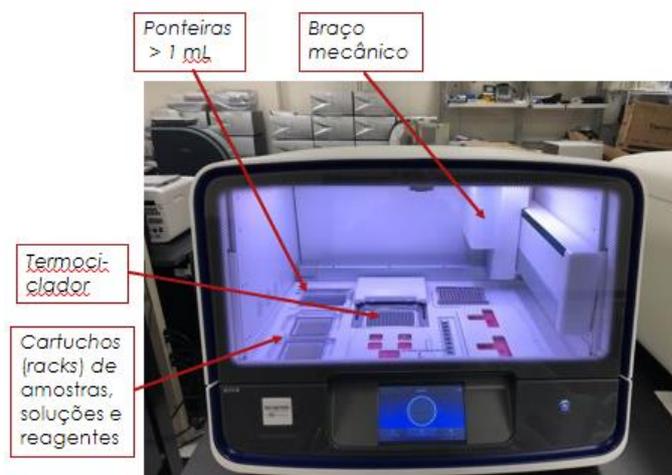


Figura 5. Componentes presentes no *Ion Chef System*.



Figura 6. Componentes presentes no *Ion Chef System*.

Portanto, o *Ion Chef* não serviu para a automação da preparação de amostras de DNA com vistas ao sequenciamento por CE no AB-3500. Foi necessária a busca por outro(s) robô(s) de pipetagem e preparo de amostras para fins de realização da proposta original.

4.4 ALTERNATIVAS E BUSCA POR OUTROS ROBÔS DE PIPETAGEM

Com a última análise do protocolo de preparação de amostras, foram demarcadas as etapas manuais com interesse em semi-automatização que o equipamento *Ion Chef* não poderia oferecer, devido à falta de equipamentos que precisariam ser utilizados. Com isso, foi feita a busca por outros robôs de pipetagens e preparo de amostras disponíveis no mercado brasileiro e que possam permitir a semiautomação do preparo de amostras para sequenciamento por EC.

Foram definidos alguns parâmetros para a busca correta dos robôs: ser personalizável, trabalhar com placas de 96 poços, realizar pipetagem de volumes entre 1 μ L e 1 mL, mistura das soluções em microplaca (vortex), termociclagem, centrifugação de microplacas. Também é necessário avaliar o custo do equipamento, o custo dos materiais consumíveis necessárias para cada “rodagem” e quantas microplacas o equipamento pode processar de forma autônoma. Com essas informações, foi feita uma tabela comparativa com os dados encontrados sobre os equipamentos selecionados para avaliação (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela comparativa das alternativas e buscas por outros robôs de pipetagem.

	OT-2 Liquid Handler (OPENTRONS)	Liquid Handling – (LABMAN)	Automated Pipetting System – BenchSmart (METTLER TOLEDO)	Andrew – The Pipetting Robot (WATERS)
Pode ser personalizável?	100% personalizável e aberto a modificações ajustáveis ao seu ensaio.	Sim	Sim	Sim
Trabalha com microplacas de 96 poços?	Sim. Compatível com tubos, microplacas, placas de poço profundo, reservatórios e adaptadores compatíveis com ANSI/SBS ou de automação.	Apenas frascos (vials).	Sim	Sim
É capaz de realizar pipetagem de volumes entre 1 μ L e 1 mL?	Canal único: 1- 1000 μ L 8 canais: 1- 300 μ L	Sim	Três cabeças de pipetagem de troca rápida do BenchSmart 96 permitem a pipetagem de 96 e 384 poços de 0,5 μ L a 1 mL.	0,2 μ L até 10 mL.
É capaz de realizar a mistura das soluções em microplaca (vortex)?	Não	Até 192 frascos agitados simultaneamente a 300 rpm	Não	Não
Realiza termociclagem?	Termociclador adaptável, porém não carrega microplacas.	Termociclador adaptável, porém não carrega microplacas.	Não	Não
Realiza centrifugação de microplacas?	Não	Frascos centrifugados a 5000 rpm	Não	Não
Quantas microplacas pode processar de forma autônoma?	11 placas	Múltiplas	4 placas	7 microplacas ou 56 tubos falcon ou 168 microtubos

Qual o custo do equipamento?	U\$ 6,800.00 a U\$ 8,600.00 dependendo do par de micropipetas ajustáveis (micropipeta monocanal de 20 a 1.000 µL ou de 8 canais de 20 a 300 µL).	Cotação solicitada em 11/04/2022. Representante respondeu não dispor de equipamentos que atendam às especificações fornecidas.	Cotação solicitada em 11/04/2022. Representante solicitou visita para melhor dimensionar necessidades e fornecer orçamento.	Cotação solicitada em 11/04/2022. Representante solicitou visita para melhor dimensionar necessidades e fornecer orçamento.
------------------------------	--	--	---	---

A partir da análise dos dados da Tabela e conversas com o Prof. Giancarlo Pasquali, o equipamento mais adequado à ACTGene escolhido para posteriores avaliações foi o *Andrew – The Pipetting Robot* (Figura 7).



Figura 7. *Andrew+ - The Pipetting Robot (WATERS).* Disponível em <https://videos.waters.com/detail/video/6157500813001/andrew-alliance---the-pipetting-robot>.

4.5 ANDREW – THE PIPETTING ROBOT

Os principais aspectos e características que levaram à escolha deste equipamento foram que ele é um equipamento aberto, isto é, sem portas para a instalação e retirada de microplacas. Ele é modulável, ou seja, os conjuntos de

módulos (dominós) para pipetagens são selecionáveis no momento da compra, o pacote não é fechado, podendo personalizar conforme a sua necessidade. Possui uma maior tolerância a ponteiros de diferentes fabricantes, e um menor custo de aquisição e manutenção, sendo um equipamento da empresa Waters Corporation - com uma força de trabalho global de mais de 7.400 funcionários, a Waters opera em 35 países, incluindo 14 unidades de fabricação e com produtos disponíveis em mais de 100 países (Waters Corporation, 2022).

Depois de avaliado todos os aspectos do robô de pipetagem *Andrew*, a decisão tomada foi seguir com os estudos para uma semiautomação do preparo de amostras para o sequenciamento em AB-3500 com o equipamento *Andrew – The Pipetting Robot*.

5 CONCLUSÃO

5.1 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS

Os objetivos iniciais do trabalho eram automatizar ou semiautomatizar os procedimentos de preparo de amostras de DNA para sequenciamento por eletroforese capilar utilizando o equipamento *IonChef* (Thermo Fisher), estudar, aprender e executar os procedimentos de preparação manual de amostras de DNA para o sequenciamento por eletroforese capilar no sequenciador AB-3500, entender a programação do *Ion Chef* para operações básicas; avaliar a possibilidade de usar o equipamento *Ion Chef* como robô de pipetagem para sequenciamento no sequenciador AB-3500 ou, então; indicar equipamentos e métodos alternativos para a (semi-)automação do preparo de amostras.

Foi realizado o estudo de todo o protocolo de amostras para o sequenciamento em AB-3500, avaliando-se a possibilidade do uso do equipamento *Ion Chef*. Porém, a partir das análises feitas, foi visto que o uso do sistema *Ion Chef* teria vários empecilhos. Ele não pode ser reprogramado, pois foi projetado para o preparo de bibliotecas de DNA destinadas ao sequenciamento no Ion GeneStudio S5 e mesmo ele sendo equipado com robô de pipetagem, termociclador e centrífugas, ele é limitado a ponteiras de 1 mL e centrífugas de tubos e não de microplacas e para as pipetagens do preparo de amostras, é necessário ponteiras entre 1 μ L e 1 mL.

Com isso, uma busca por outros robôs de pipetagem foi feita, escolhendo-se alguns parâmetros para obter uma busca selecionada. Os parâmetros (Tabela 1) foram definidos a partir da observação do protocolo das etapas de marcação e sequenciamento em sequenciador AB-3500 e o quais os equipamentos e características os robôs deveriam apresentar para se obter uma semiautomação ou total das etapas do protocolo. O resultado da pesquisa mostrou quatro robôs que poderiam se encaixar para o fim desejado: *OT-2 Liquid Handler, Liquid Handling – Labman; Automated Pipetting System – BenchSmart, Andrew – The Pipetting Robot*.

O equipamento selecionado foi o *Andrew – The Pipetting Robot*, pois entre os selecionados para a pesquisa, foi o que mais se adequou ao propósito desejado. Ele é um equipamento aberto, o que facilita muito o manuseio, não possui portas para a

colocação e retirada de microplacas. Além de possui uma maior tolerância a ponteiros de outros fabricantes, barateando o custo de rodagem. É um equipamento da Empresa Waters Corporation, empresa pioneira em venda de equipamentos de última geração, operando em vários países e possuindo produtos disponíveis em mais de 100 países.

As perspectivas futuras de trabalho é o estudo mais profundo do equipamento selecionado Andrew – The pipetting robot, a fim de uma (semi-) automação do protocolo das etapas de marcação do sequenciamento para o sequenciador AB-3500, visando a agilidade do processo para benefício da Empresa ACTGene.

REFERÊNCIAS

- DOLNÍK, V. (1999) DNA Sequencing by capillary electrophoresis (review). **J Biochem Biophys Methods** 41: 103-19.
- DOVICH, N., J. (1997) DNA sequencing by capillary electrophoresis. **Electrophoresis** 18: 2393-9.
- MARDIS, E. (2017) DNA sequencing technologies: 2006-2016. **Nature Protocols** 12: 213-218.
- MARDIS, E. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics** 9: 387-402.
- ALY, S. M.; SABRI, D. M. (2015) Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit. **Archiwum medycyny sądowej i kryminologii** 65: 260-71.
- BEHJATI, S., TARPEY, P. S. (2013) What is next generation sequencing? **Arch Dis Child Educ Pract Ed.** 98: 236-8.
- DOVICH, N., J.; ZHANG, J. (2001) DNA Sequencing by capillary array electrophoresis. **Methods Mol Biol** 167: 225-39.
- HEATHER, J. M. ; CHAIN, B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics** 107 (1): 1-8.
- KARGER, B. L.; GUTTMAN, A. (2009) DNA sequencing by CE. **Electrophoresis** 30 Suppl 1(Suppl 1): 196-202.
- MCGINN, S.; GUT, I. G. (2013) DNA sequencing – spanning the generations. **New Biotechnology** 30 (4): 366-72.
- SLATKO, B., E.; ALBRIGHT, L., M. (2001) Denaturing gel electrophoresis for sequencing. **Curr Protoc Mol Biol.** Chapter 7: Unit 7.6.

BECK, T. F.; MULLIKIN, J. C.; BIESECKER, L. G. (2016) Systematic evaluation of sanger validation of next-generation sequencing variants. **Clinical Chemistry** 62 (4): 647-54.

FRANÇA, L. T. C.; CARRILHO, E.; KIST, T. B. L. (2002) A review of DNA sequencing techniques. **Quartely Reviews of Biophysics** 169-200.

GREEN, E., WATSON, J. & COLLINS, F. (2015) Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. **Nature** 526: 29-31.

KIJAK, G. H.; SANDERS-BUEL, E.; PHAM, P.; HARBOLICK, E.,A.; OROPEZA, C.; O'SULLIVAN, A.; BOSE, M.; BECKETT, C. G.; MILAZZO, M.; ROBB, M. L.; et al. (2019) Next-generation sequencing of HIV-1 single genome amplicons. **Biomol Detect Quantif.** 17:1000080.

Applied Biosystems (2010) 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide. Life Technologies Corporation Part Number 4401661 Rev. C 06/2010. 369 p.

Thermo Fisher Scientific (2015) Ion S5 and Ion S5 XL Instrument. Catalog Number A27212, A27214. Pub. No. MAN0010842 Rev. A.0.

Thermo Fisher Scientific (2019) Ion PGM Hi-Q View Chef Kits. Catalog Numbers A29902, A30798. Pub. No. MAN0014572 Rev. E.0.