

Manual de Utilização de Marcadores Moleculares para Análise de Diversidade Genética

Foto: Gláucia Salles Cortopassi Buso



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos291

Manual de Utilização de Marcadores Moleculares para Análise de Diversidade Genética

Gláucia Salles Cortopassi Buso
Ana Takagaki Yamaguishi
Vânia Cristina Rennó Azevedo
Douglas Arend Leão
Marco Antonio Ferreira
Marcio de Carvalho Moretzsohn
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral
Andrea Mazzucato

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações (CLP)

Presidente: Lúcio Brunale
Secretária-Executiva: Lígia Sardinha Fortes
Membros: José Roberto de Alencar Moreira
 Diva Maria de Alencar Dusi
 Regina Maria Dechechi G. Carneiro
 Samuel Rezende Paiva
 Jonny Everson Scherwinski Pereira
Suplentes: João Batista Tavares da Silva
 Margot Alves Nunes Dode

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias
Ficha catalográfica: Rosameres Rocha Galvão
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães
Foto da capa: Glaucia Salles Cortopassi Buso

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

As opiniões nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Manual de utilização de marcadores moleculares para análise de diversidade genética / Glaucia Salles Cortopassi Buso... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009.
30 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 291).

1. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2. Biologia molecular. 3. Marcadores moleculares. I. Buso, Glaucia Salles Cortopassi. II. Yamaguishi, Ana Takagaki. III. Azevedo, Vânia Cristina Rennó. IV. Leão, Douglas Arend. V. Ferreira, Marco Antonio. VI. Moretzsohn, Márcio de Carvalho. VII. Amaral, Zilneide Pedrosa de Souza. VIII. Mazzucato, Andrea. IX. Série.

Autores

Glaucia Salles Cortopassi Buso

Engenheira Agrônoma, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ana Takagaki Yamaguishi

Bióloga, Ph.D., Gerente Técnica do Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Bióloga, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Douglas Arend Leão

Químico, B.Sc., Bolsista do Programa Biodiversidade Brasil-Itália (PBBI)

Marco Antonio Ferreira

Químico, B.Sc., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Márcio de Carvalho Moretzsohn

Engenheiro Agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Zilneide Pedrosa de Souza Amaral

Ensino Médio, Assistente de Laboratório da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Andrea Mazzucato

Bióloga, Ph.D., Professora da Universidade de Tuscia, Itália

Apresentação

Este manual foi um dos objetivos do Programa Biodiversidade Brasil-Itália (PBBI). Iniciada em 2003, essa cooperação bilateral resultou em um programa de três anos, o qual teve como base metodologias participativas, capacitação, recuperação do conhecimento tradicional, pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico, promoção de redes e feiras de troca.

No âmbito da pesquisa, um dos objetivos do programa foi o treinamento de técnicos e estudantes no Laboratório de Genética Vegetal, e para facilitar o treinamento foi elaborado o MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA, que tem como objetivo a introdução às técnicas básicas utilizadas no projeto, como PCR e suas variações, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”, ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”, ou sequências simples repetidas) e ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”, ou Inter Sequências Simples Repetitivas). São discutidas as condições que afetam essas técnicas, os cuidados, a forma de avaliação dos resultados e as aplicações nos mais diversos campos do conhecimento.

Mauro Carneiro
Chefe-Geral

Sumário

Introdução	07
Introdução à biologia molecular e a marcadores moleculares	07
Reação da polimerase em cadeia (PCR)	08
Protocolos laboratoriais para PCR: RAPD, SSR, e ISSR	09
Extração de DNA genômico total de plantas.....	09
Quantificação de DNA em gel de agarose.....	11
Componentes da reação de PCR.....	11
Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD).....	13
Procedimentos para reação RAPD.....	13
Microssatélites.....	15
ISSR - Inter Simple Sequence Repeats ou Inter Sequências Simples Repetitivas.....	17
Análise dos resultados	19
Abordagens metodológicas utilizadas no tratamento de dados gerados por RAPD e ISSR.....	19
Abordagens metodológicas utilizadas no tratamento de dados gerados por SSR.....	21
Referências bibliográficas	23
Anexos	26

Manual de Utilização de Marcadores Moleculares para Análise de Diversidade Genética

Gláucia Salles Cortopassi Buso
Ana Takagaki Yamaguishi
Vânia Cristina Rennó Azevedo
Douglas Arend Leão
Marco Antonio Ferreira
Marcio de Carvalho Moretzsohn
Zilneide Pedrosa de Souza Amaral
Andrea Mazzucato

Introdução

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. Os marcadores têm sido utilizados em análise genética com os mais diversos objetivos, como na identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares e paternidade, na estimativa de diversidade genética, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos. Os marcadores podem diferir entre si em relação a características importantes, como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro.

As técnicas moleculares mais utilizadas envolvem dois pontos-chave: o primeiro é a escolha da região do genoma que será estudada e que terá maior probabilidade de revelar diferenças entre indivíduos e/ou espécies; o segundo é a necessidade de se amplificar seletivamente o DNA desta região do genoma para que possa ser visualizado facilmente, mesmo com pouco material para a análise. Para se amplificar somente a parte do genoma escolhida, utiliza-se a PCR ("Polymerase Chain Reaction", ou reação de polimerase em cadeia). Por meio do aumento e diminuição de temperatura repetidamente, da adição de uma enzima (Taq DNA polimerase) e de iniciadores (primers), o DNA é amplificado em ritmo exponencial.

O objetivo deste manual é a introdução às técnicas básicas, como PCR e suas variações, RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA", ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), microsatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats", ou ainda sequências simples repetidas) e ISSR ("Inter Simple Sequence Repeats", ou Inter Sequências Simples Repetitivas). Serão discutidas as condições que afetam essas técnicas, os cuidados, a forma de avaliação dos resultados e as aplicações nos mais diversos campos do conhecimento.

Introdução à biologia molecular e a marcadores moleculares

O surgimento de técnicas que envolvem o uso de marcadores moleculares propiciou um grande avanço nos estudos de genética genômica e em programas de melhoramento genético. Diversas técnicas estão hoje disponíveis para detecção da variabilidade genética ao nível de sequências de DNA, ou seja, de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares com herança mendeliana dominantes ou codominantes, e com ampla cobertura genômica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares baseados em DNA podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los: marcadores de hibridização e marcadores de amplificação de DNA. No primeiro caso, utiliza-se uma sonda de DNA marcada com isótopo radioativo ou

fluorescente, complementar à região do genoma que se deseja estudar. No segundo, são utilizados pares de oligonucleotídeos sintéticos de DNA complementares para uma dada região do genoma, permitindo uma amplificação por PCR. Neste caso, ocorre a amplificação de um número variável de cópias apenas do segmento que se deseja estudar. A vantagem desse último está na dispensa do emprego de material radioativo, como também na realização de análises a partir de pequenas quantidades de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Com o desenvolvimento técnico, vários avanços significativos têm sido obtidos por meio do isolamento, da análise e da síntese de sequência de DNA e genes, além da utilização desses DNAs para o estudo da sua função e dos mecanismos que controlam sua expressão, e como marcas identificadoras de indivíduos, populações, espécies, gêneros, entre outros.

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando ao entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas, envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos.

PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e na extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (primers) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Esses primers são sintetizados artificialmente, de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região-alvo (Figura 1).

Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: desnaturação, anelamento do primer e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada por elevação da temperatura do sistema para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e da sequência do primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA, isto é, de cada primer com as sequências complementares que flanqueiam a região-alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C, a fim de que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos, utilizando-se como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da sequência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica, de forma que, depois de apenas 20 ciclos, são produzidos mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência-alvo. Essa escala de amplificação permite, portanto, iniciar a reação com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse (ANTONINI et al., 2004).

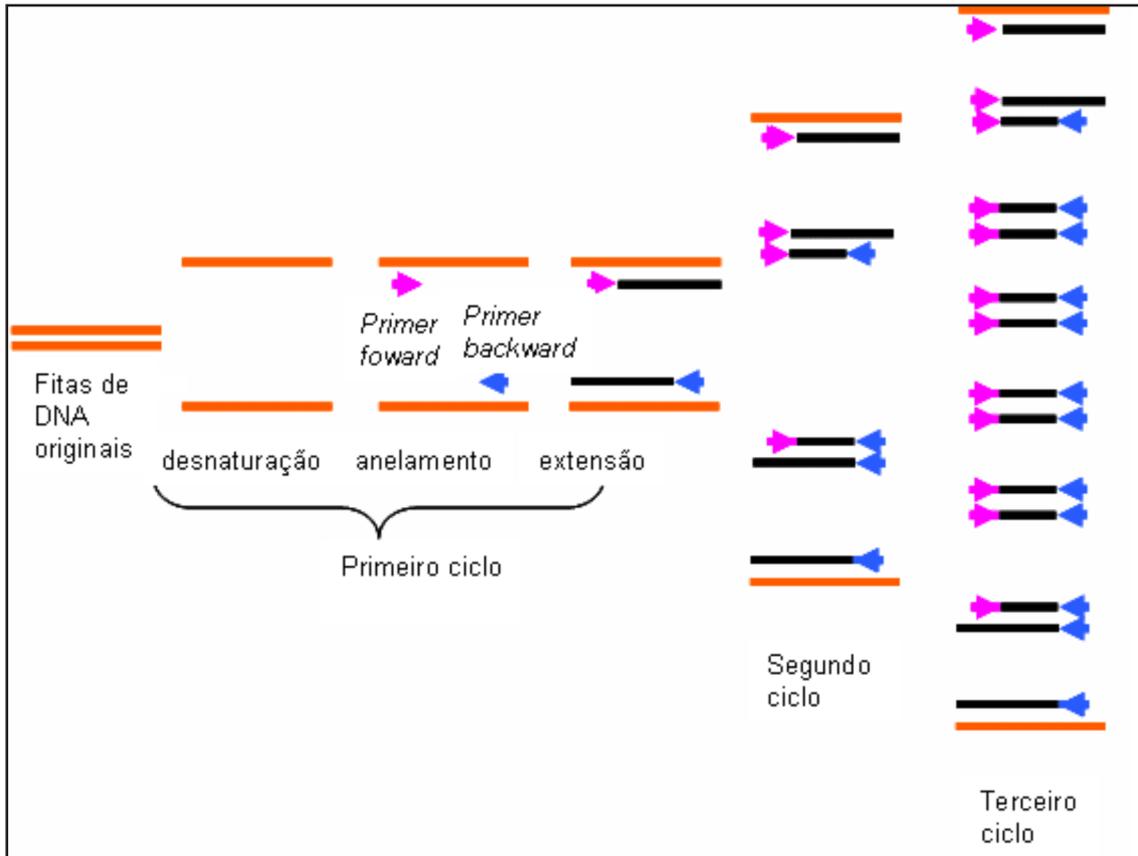


Figura 1. Esquema da reação de PCR.

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Um dos aspectos da revolução causada pela PCR foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese por meio de corantes específicos para DNA (um exemplo é o brometo de etídio). Entretanto, a construção de primers para amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse. Para se conhecer estas sequências é necessária a clonagem e o sequenciamento da região. Portanto, a PCR apresentou, de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares. Atualmente, alguns marcadores são baseados em primers com sequências aleatórias, o que popularizou as análises genéticas, pois, nesses casos, não é necessário conhecer previamente as sequências das espécies-alvo dos estudos genéticos.

Protocolos laboratoriais para PCR: RAPD, SSR e ISSR

Extração de DNA genômico total de plantas

Vários procedimentos de extração de DNA de tecidos vegetais ou de micro-organismos têm sido descritos na literatura, com algumas modificações, objetivando a resolução de problemas específicos da espécie em estudo. Os protocolos caracterizam-se por utilizar o detergente catiônico CTAB – “Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide” – (soluções no Anexo 2) no tampão de extração e são, portanto, comumente denominados de protocolos CTAB (Figura 2).

A maioria dos protocolos de extração de DNA envolve cinco etapas básicas. Na primeira etapa, utiliza-se algum tipo de maceração mecânica para romper as paredes e membranas celulares do material, normalmente feita na presença de nitrogênio líquido ou utilizando-se máquinas para maceração com “beads” de cerâmica. Na segunda etapa, as células maceradas são misturadas em um tampão de extração contendo algum detergente (CTAB), antioxidantes, EDTA e agente tamponante, visando à solubilização de membranas lipoproteicas e à desnaturação de proteínas, enquanto o DNA é protegido da ação de enzimas de degradação. Essa suspensão é submetida a temperaturas entre 50 e 65 °C durante 15 a 60 minutos, para facilitar a solubilização e a homogeneização. Na terceira etapa, a suspensão é submetida à extração com um solvente orgânico (clorofórmio-álcool isoamílico). As fases orgânica e aquosa são separadas por meio de centrifugação. Nesta extração, lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são retidos na fase orgânica inferior, enquanto que o DNA, o RNA e alguns polissacarídeos são retidos na fase superior (aquosa). Na quarta etapa, um álcool (isopropanol ou etanol) é adicionado à fase aquosa. Na presença de álcool, o DNA forma um precipitado, frequentemente visível, que pode ser “pescado” ou “peletizado” por centrifugação, após incubação a -20 °C por um tempo que pode variar de 30 minutos a 12 horas. Na quinta e última etapa, após lavagens do precipitado de DNA/RNA com álcool, adiciona-se um tampão Tris- EDTA contendo RNase para degradar o RNA, restando apenas o DNA genômico desejado.

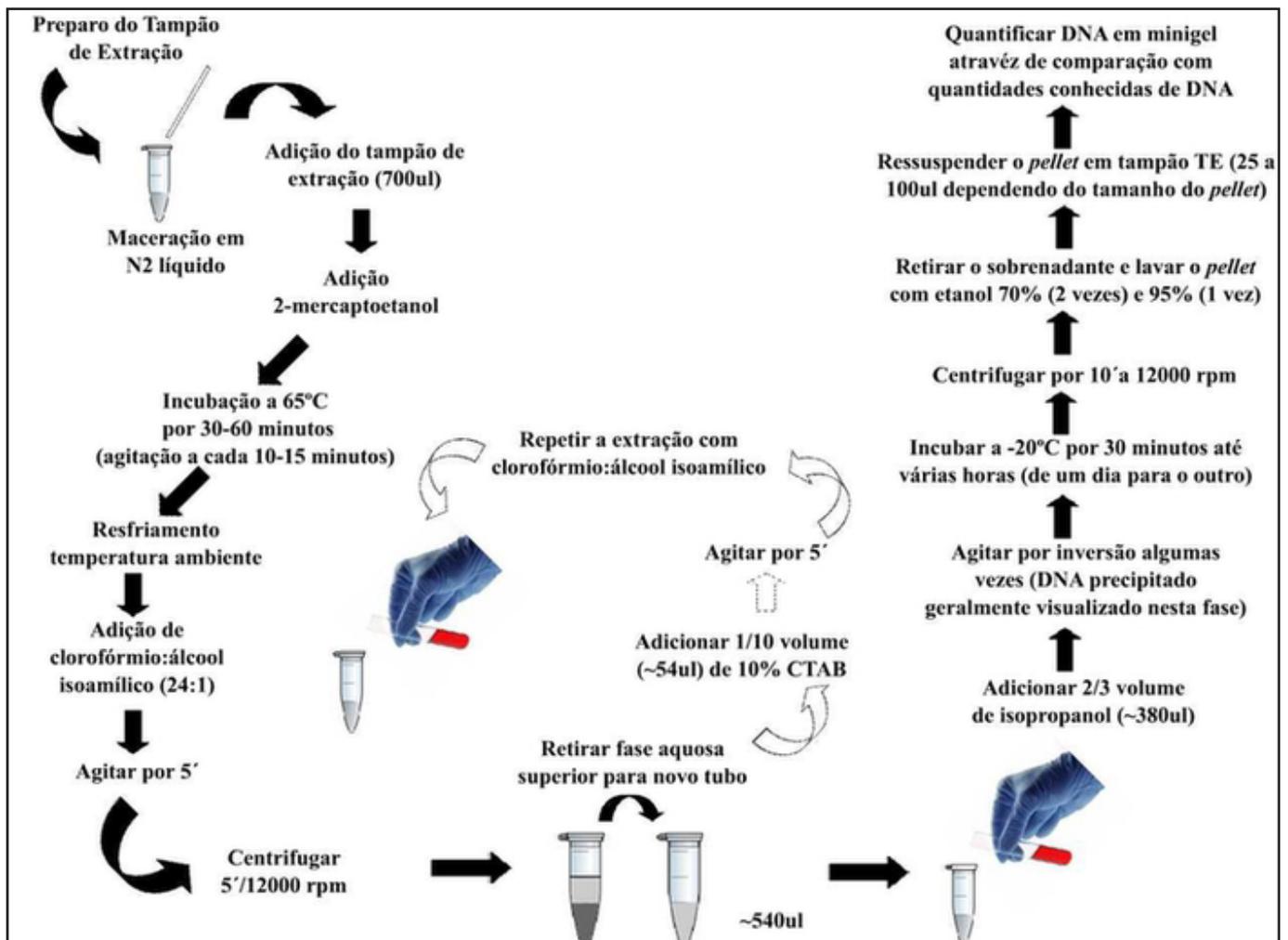


Figura 2. Esquema de extração de DNA.

Quantificação de DNA em gel de agarose

Após finalizar os procedimentos de extração de ácidos nucleicos, deve-se verificar a quantidade e a qualidade do DNA obtido. A quantidade de DNA pode ser determinada por meio de dois métodos: a espectrofotometria e a eletroforese em gel de agarose, por intermédio do qual se faz a leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio sob luz UV. O brometo de etídio é um corante que se intercala nas moléculas dos ácidos nucleicos, sendo que a luz ultravioleta induz sua fluorescência. A quantidade observada sob luz UV é proporcional à concentração de DNA da amostra aplicada no poço do gel de agarose. Para quantificá-la, faz-se a foto em um fotodocumentador e se compara a fluorescência da amostra àquela de um padrão conhecido (Figura 3).

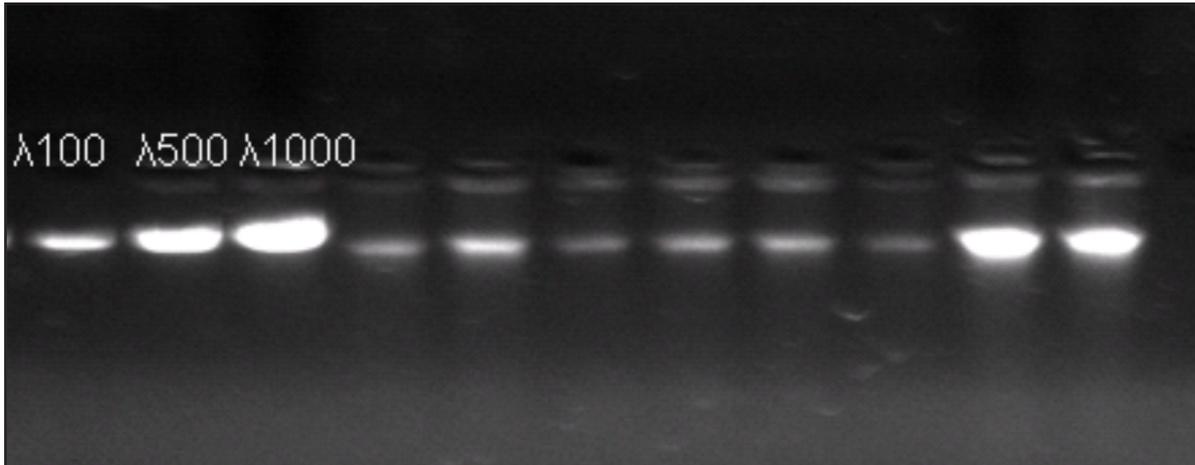


Figura 3. Quantificação de DNA, por comparação com DNA padrão do fago lambda. A segunda amostra após os marcadores tem aproximadamente 100 ng e as duas últimas 1000 ng.

Para o preparo do gel, dissolve-se a agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, por meio de fusão a alta temperatura em forno de micro-ondas, até que a solução torne-se clara e transparente. Adiciona-se 0,003% de brometo de etídio à solução ainda quente ($\sim 50^{\circ}\text{C}$), que, então, é vertida na cavidade da cuba de eletroforese, geralmente de acrílico. Em seguida, posiciona-se adequadamente o pente no suporte para a formação dos poços. Depois da solidificação do gel – cuja densidade é determinada pela concentração da agarose – devido à diminuição da temperatura, as amostras podem ser aplicadas.

Quando o campo elétrico é aplicado através do gel, o DNA, que é carregado negativamente em um pH neutro, migra para o ânodo (pólo positivo). A taxa de migração é determinada por uma série de parâmetros, dentre os quais podem ser citados: concentração da agarose, peso molecular do DNA, conformação do DNA, voltagem aplicada (para uma máxima resolução, a voltagem não deve ser maior do que 5 V/cm – entenda-se pela medida em cm a distância entre os eletrodos da cuba de eletroforese), direção do campo elétrico, composição do tampão, presença de agentes intercalantes, entre outros.

Componentes da reação de PCR

- **Água:** a qualidade da água do laboratório pode influenciar na reação. De preferência, deve-se utilizar água filtrada em aparelho Milli-Q e esterilizada por autoclavagem, renovando-se os frascos semanalmente.
- **Tampão:** o tampão da reação de PCR, concentrado 10X, é fornecido juntamente com a Taq polimerase e tipicamente contém 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl e 15 mM MgCl₂. O mais importante é observar quanto o tampão contém de magnésio, que é fundamental para a atividade da Taq DNA polimerase.

- dNTPs: os dNTPs podem vir na forma de uma mistura, em uma concentração de 20 mM cada, e devem ser mantidos em *freezer*. Os estoques para uso diário devem estar na concentração de 2,5 mM e podem ser preparados em volumes de 800 μL , por exemplo. Para preparar este estoque de uso, deve-se pipetar 100 μL de dNTP 20 mM e adicionar 700 μL de água. Manter as alíquotas em *freezer*, usar conforme a necessidade e renovar sempre estes estoques. Além disso, os dNTPs podem vir separadamente, em concentrações, por exemplo, de 100 mM. Para preparar a mistura, deve-se utilizar partes iguais, de forma a reduzir a concentração de cada nucleotídeo para 25 mM, e depois preparar os estoques de uso diário, diluindo-se 10X, para chegar a uma concentração de 2,5 mM. As concentrações finais de dNTPs na reação variam de um laboratório para outro. Na formulação original proposta por Williams et al., 1990, a concentração é 100 μM .
- *Primers*: vêm na forma de *pellets* liofilizados. Os de sequência arbitrária são comercializados pela *Operon Technologies, CA, USA*, sendo fornecidos em *kits* contendo 20 oligonucleotídeos. Cada *kit* é designado por uma letra do alfabeto – A, B, C, D, etc. – e os respectivos primers, por algarismos: OPA-1, OPA-2, OPA-3, etc.

Para calcular o volume de tampão TE a ser adicionado aos *pellets*, verificar no folheto que acompanha o *kit* o peso molecular de cada um deles. Preparar estoques de 50 μM , seguindo o raciocínio do exemplo abaixo, de acordo com informações fornecidas pelo fabricante:

OP-3: 5' CCTGATCACC 3' – Peso Molecular 2939 – *Pellet* com 17 μg

$2939 \mu\text{g} / \mu\text{L} = 1 \text{ Molar}$

$2939 \mu\text{g} / 1 \times 10^{-3} \mu\text{L} = 1 \text{ mM}$

$2939 \mu\text{g} / 1 \times 10^{-6} \mu\text{L} = 1 \mu\text{M}$

$2939 \mu\text{g} / 2 \times 10^{-4} \mu\text{L} = 50 \mu\text{M}$

Se o frasco contém 17 μg , para se obter uma solução 50 μM devem ser adicionados 116 μL de água milli-Q autoclavada. Os estoques de 50 μM devem ser mantidos em *freezer*. Para obter a concentração de trabalho diário, deve-se diluir os estoques de forma a obter uma concentração de 2,5 μM , ou seja, 1/20. Ao adicionar 2,5 μL da solução de *primer* (2,5 μM) na reação de RAPD de 25 μL , a concentração final de primer será de 250 nM. Concentrações entre 200 a 400 nM são as mais usuais.

- Mg^{++} : O magnésio é um cofator da Taq DNA polimerase. A concentração deste cofator na reação pode variar, em geral, desde 1,0 até 4,0 mM, e deve ser otimizada para cada enzima e material biológico. O magnésio vem na forma de MgCl_2 , acompanhando o tubo de enzima, em uma concentração de 50 mM. É conveniente reduzir a concentração do magnésio para 10 mM, por exemplo, uma vez que ele precipita em pH alcalino (o tampão da reação tem pH em torno de 8,0) e em baixa temperatura. Verificar, também, se o tampão da Taq já contém MgCl_2 . Em caso afirmativo, acrescentar somente o volume necessário para obter a concentração final desejada.
- Taq DNA polimerase: a Taq vem em tampão contendo glicerol, em concentrações de 5 unidades/ μL . São usuais concentrações de 1, 1,5 e 2 unidades por reação.
- DNA molde: os DNAs devem ser extraídos e quantificados em gel de agarose, observando-se se há degradação ou não. Esporadicamente, deve-se verificar em gel a integridade dos DNAs mantidos em *freezer* ou em geladeira. As diluições de uso (3 ng/ μL) são feitas em H₂O ou em tampão Tris-EDTA 10 mM (Anexo).

As concentrações de DNA genômico, necessárias à reação de amplificação na presença de *primers* arbitrários (RAPD), variam em função da espécie. Para a maioria das espécies, a concentração ideal está em torno de 3 ng/ μL .

Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Uma destas variações é a tecnologia RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA", ou DNA polimórfico amplificado ao acaso), que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma com o uso de *primers* de sequência arbitrária.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a ideia de se utilizar *primers* mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade do conhecimento prévio da sequência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. Williams et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD. Welsh; McClelland (1990), por sua vez, propuseram a denominação de AP-PCR ("Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction"), uma vez que os primers possuem sequência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso, e sim em lugares específicos no genoma (Figura 4). O experimento desse grupo foi essencialmente a geração de "fingerprints" (impressões digitais) genômicos simples e reproduzíveis para a identificação de linhagens, utilizando-se géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução, juntamente com *primers* um pouco mais longos.

Independente do nome utilizado e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR com o uso de *primers* de sequência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para a análise genômica de indivíduos e populações. Além de facilitar e acelerar os estudos que já ocorriam com as espécies tradicionais, a tecnologia RAPD trouxe uma verdadeira "democratização" da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas.

A principal desvantagem dos marcadores RAPD é seu baixo conteúdo informativo, uma vez que um único alelo é amplificado por loco. O polimorfismo é detectado pela presença ou ausência de bandas no gel e, portanto, marcadores RAPD são tipicamente dominantes.

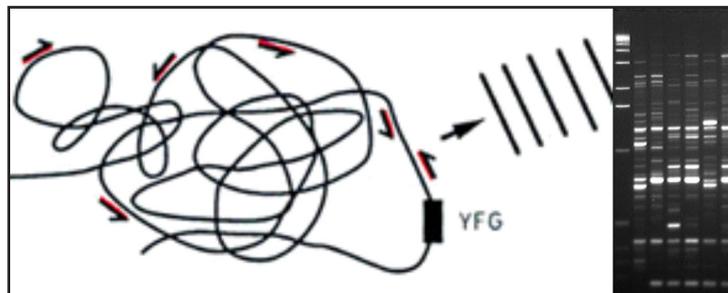


Figura 4. Esquema de RAPD: os primers possuem sequência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso, e sim em lugares específicos no genoma. Ao lado, um gel de agarose mostrando os fragmentos amplificados por essa técnica.

Procedimentos para reação RAPD

A Figura 5 apresenta um esquema do protocolo para análise com marcadores RAPD. Geralmente, a reação é feita em volume de 13 μL contendo o *primer* (5 μL a 30 μM) e os demais reagentes: 1,3 μL de tampão de reação 10X – 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl e MgCl_2 15 mM; 0,25 mM de cada um dos dNTPs; 0,26 μL de enzima Taq DNA polimerase 5 U/ μL ; 5-20 ng de DNA genômico; e água milli-Q para completar o volume da reação. A PCR é feita a 45 ciclos de 92°C durante 1 minuto, 35°C durante 1 minuto, 72°C durante 3 minutos, seguidos de um ciclo final de extensão a 72°C durante 7 minutos.

Os produtos de RAPD são revelados por eletroforese em agarose 1,5% (p/vol) em TBE 1X, a 65 volts, 90 miliamperes, durante 4 horas, utilizando-se o marcador de peso molecular 1kb. A revelação das bandas de DNA é feita com brometo de etídio 0,5 mg/mL, visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta, sendo as imagens fotodocumentadas em computador (Figura 6).

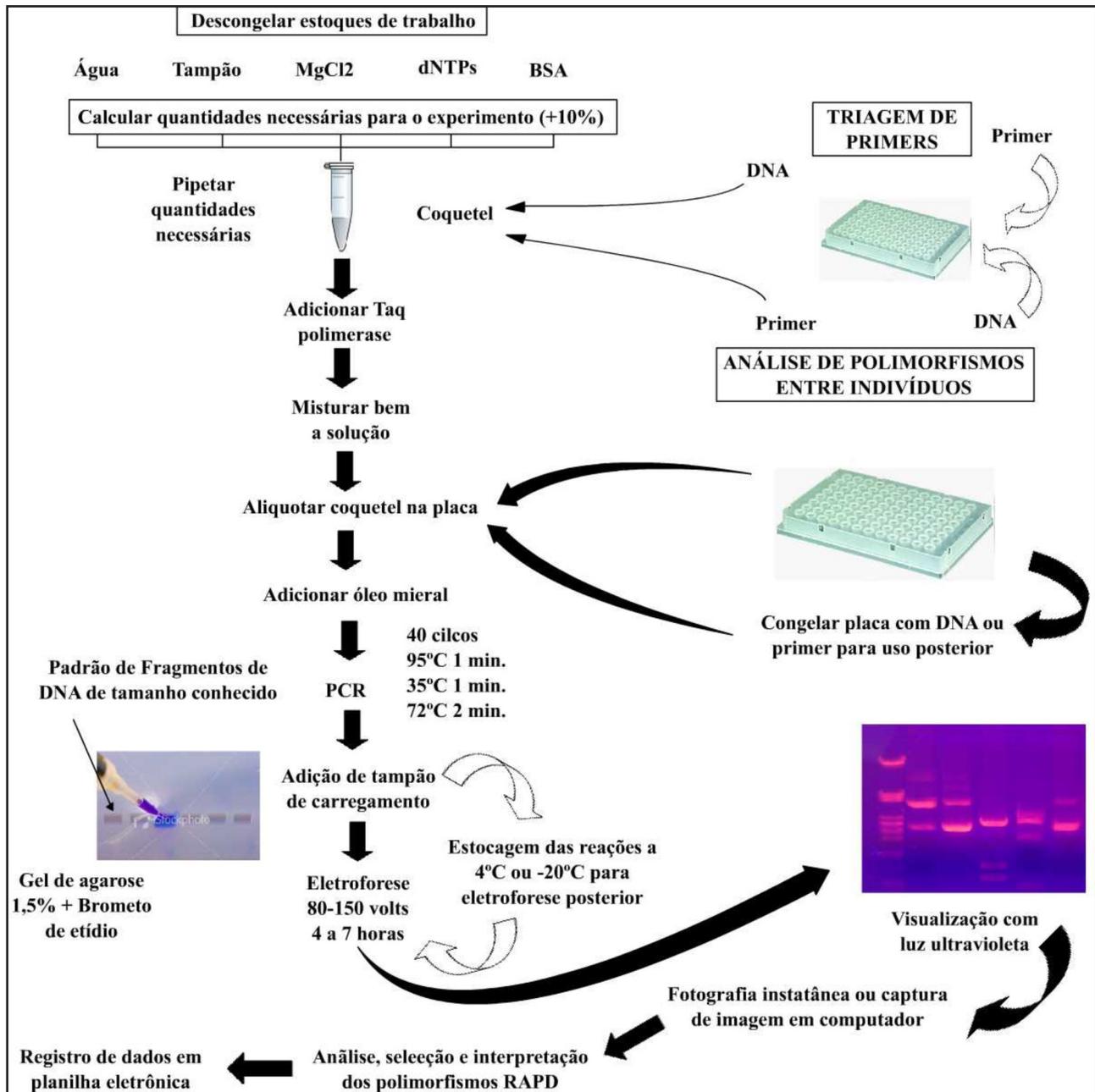


Figura 5. Esquema do protocolo para RAPD (Fonte: adaptado de Antonini et al., 2004).

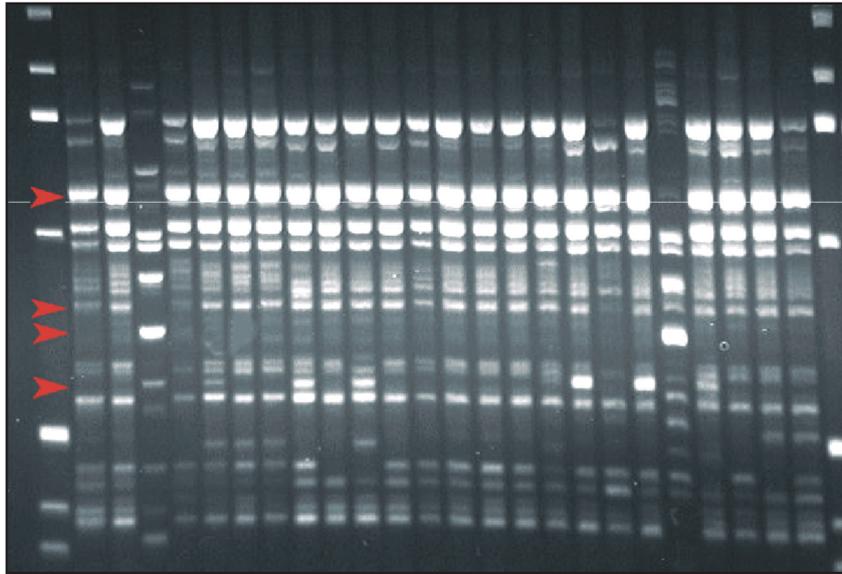


Figura 6. Gel de agarose 1,5% evidenciando o polimorfismo dos locos RAPD.

Microssatélites

O genoma dos eucariotos contém sequências repetitivas que podem ser utilizadas como marcadores de DNA. As sequências simples repetidas SSR ("Simple Sequence Repeats") ou STMS ("Sequence Tagged Microsatellite Site"), também denominados microssatélites, são um dos marcadores mais polimórficos encontrados hoje nos genomas de animais e plantas. Marcadores SSR são caracterizados por uma sequência de 1 a 6 nucleotídeos, que pode estar repetida em tandem. Estas repetições surgem provavelmente de "escorregões" da enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA, da recombinação desigual ou do alinhamento incorreto das fitas de DNA. O polimorfismo alélico ocorre em um loco SSR devido a mudanças no número de repetições (Figura 7). Estes polimorfismos são detectados por meio de uma amplificação de DNA com o uso de *primers* que flanqueiam as repetições. Os produtos dessa amplificação são visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, ou em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, ou, ainda, por meio de marcação com fluorescência e leitura a laser.

Os microssatélites apresentam numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores, dentre as quais pode-se destacar: são altamente polimórficos e informativos; a herança é codominante, o que permite a discriminação entre homocigotos e heterocigotos; são multialélicos; ocorrem abundantemente em genomas eucariotos; são baseados em PCR e, portanto, necessitam de pequena quantidade de DNA; são altamente reproduzíveis; não requerem o uso de radioatividade; estão bem dispersos no genoma, em regiões codificadoras e não codificadoras (ZANE et al., 2002); e os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas.

Estudos em bancos de dados mostram que a frequência e a distribuição dos microssatélites diferem em plantas e animais. O genoma de plantas contém, em média, dez vezes menos microssatélites do que o genoma humano (POWEL et al., 1996). A repetição (CA)_n é raramente encontrada em plantas, mas ocorre com frequência em animais. As repetições mais comuns em plantas são (AT)_n, (GA)_n, (AC)_n, (AAT)_n e (AAC)_n (WANG et al., 1994; GUPTA; VARSHNEY, 2000). O DNA de organelas tem baixa frequência de SSRs (1 por 317 Kb) (WANG et al., 1994).

Os fragmentos devem ser primeiramente visualizados em géis de agarose a 3.5%. Para microssatélites, o gel de agarose deve ser mais concentrado para possibilitar a visualização dos diferentes alelos. Após a otimização, o resultado da amplificação de marcadores SSR pode ser visualizado em géis de poliacrilamida desnaturante a 5%, revelado com AgNO₃ (BASSAM et al., 1991; CRESTE et al., 2001).

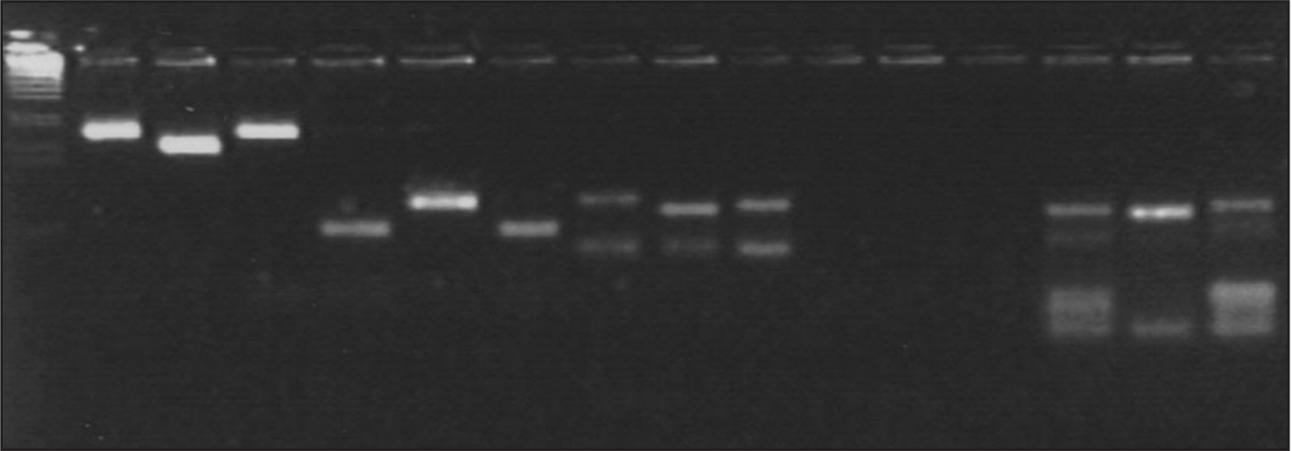


Figura 8. Gel de agarose 3.5% mostrando a amplificação de 5 locos SSR, utilizando-se 3 amostras de pimenta. Os três primeiros locos estão com as condições de PCR otimizadas. Para o quarto loco, a temperatura de anelamento deve ser reduzida e para o último deve ser aumentada.

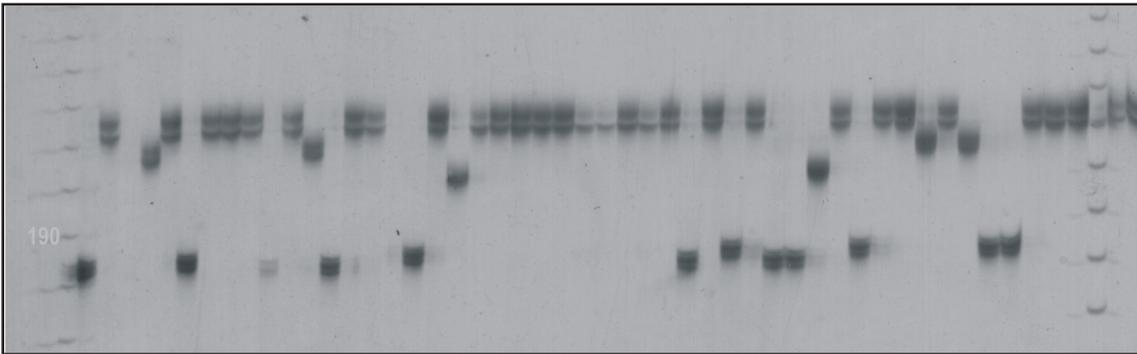


Figura 9. Gel de poliacrilamida (5%) com amplificação de 48 acessos representativos da coleção de germoplasma de feijão, mantida pela Embrapa Arroz e Feijão, com o primer SSR PV-31. As colunas 1 e 49 correspondem ao DNA padrão de 10 pb.

ISSR – Inter Simple Sequence Repeats, ou Inter Sequências Simples Repetitivas

A técnica de marcadores ISSR envolve a amplificação de DNA por PCR, utilizando-se um único primer composto de uma sequência de microssatélite, ancorado na região 3' ou 5' por dois a quatro nucleotídeos arbitrários e sempre degenerados (GONZALEZ, et al., 2005) (Figura 10). São, supostamente, marcadores nucleares neutros e dominantes. A utilização de ISSR tem sido uma forma rápida, simples e barata de acessar a diversidade, identificar cultivares e populações geneticamente próximas e estudar processos evolucionários, como sistemas reprodutivos e fluxo gênico (SIRCARD, et al., 2005). Um trabalho recente feito por Gonzalez et al. (2005) mostrou que esse marcador foi muito útil para diferenciar populações próximas de feijão.

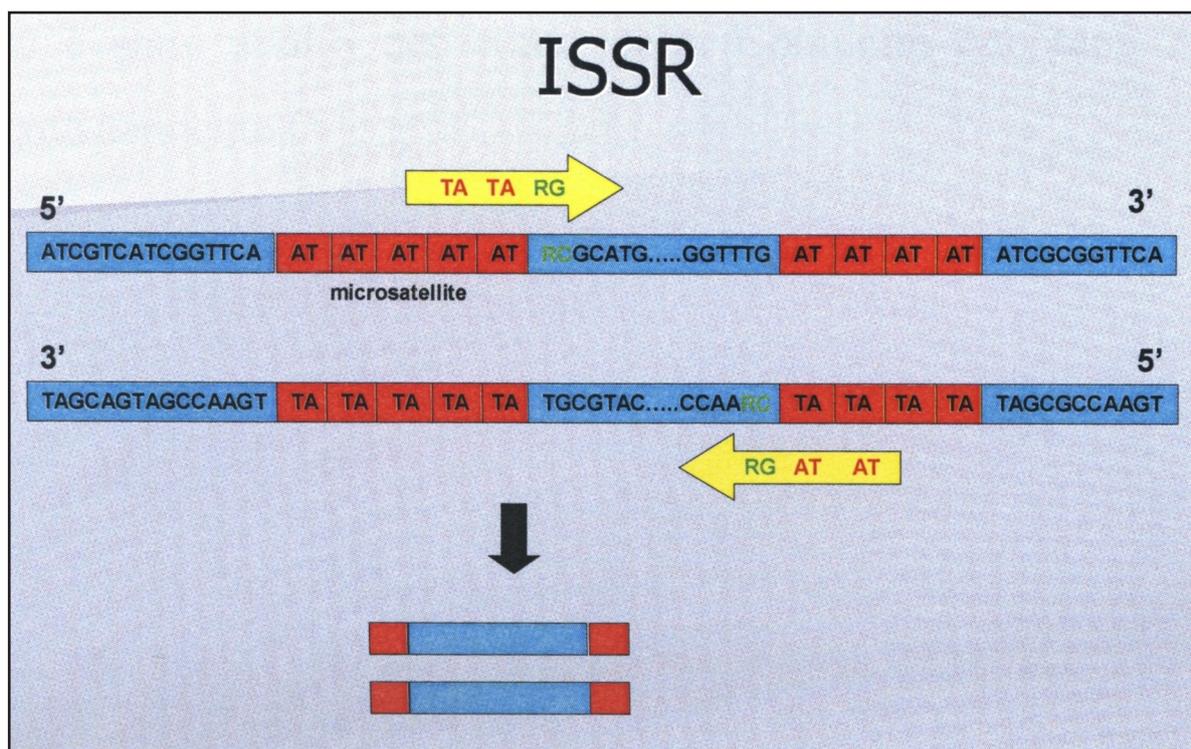


Figura 10. Esquema do desenho de primers ISSR e da amplificação (Fonte: GIANFILIPPI, 2006).

Reação ISSR otimizada no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia:

Reagentes	Conc. Final	Vol.
H ₂ O		2,84
Buffer 10X	1X	1,3
dNTPs	0,25 mM	1,3
BSA (2,5µg/µL)	0,25 µg/µL	1,3
Primer (1,2 µM)	0,28 µM	3,0
Taq (5 U/ul)	1U	0,26
TOTAL		13,0

Tabela 1. Primers utilizados em estudos genéticos de feijão no Laboratório da Universidade de Viterbo e otimizados no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Temperatura anelamento 48°C	Degeneração	Temperatura anelamento 48°C	Degeneração
ISSR1 (GACA) ₃ RG	R= A+G	ISSR7 (AG) ₈ YG	Y= C+T
ISSR2 (GACAC) ₂		ISSR8 (CA) ₈ RY	R= A+G
			Y= C+T
ISSR3 (GA) ₈ RG	R= A+G	ISSR9 (AC) ₈ YA	Y= C+T
ISSR4 YR(GACA) ₃	Y= C+T	ISSR10 (GA) ₈ YT	Y= C+T
	R=A+G		
ISSR5 (ACTG) ₃ RG	R= A+G	ISSR11 (GT) ₈ YC	Y== C+T
ISSR6 (GACA) ₃ RT	R= A+G	ISSR12 BDB(CA) ₇	B= G+T+C
			D= G+A+T

Programa da reação de PCR no termociclador:

Temp. Anelamento 48°C
 1- 94°C 5 min
 2 - 35 vz
 94°C 45 seg
 48°C 45 seg
 72°C 1,5 min
 3- 72°C 7 min
 4- 4°C

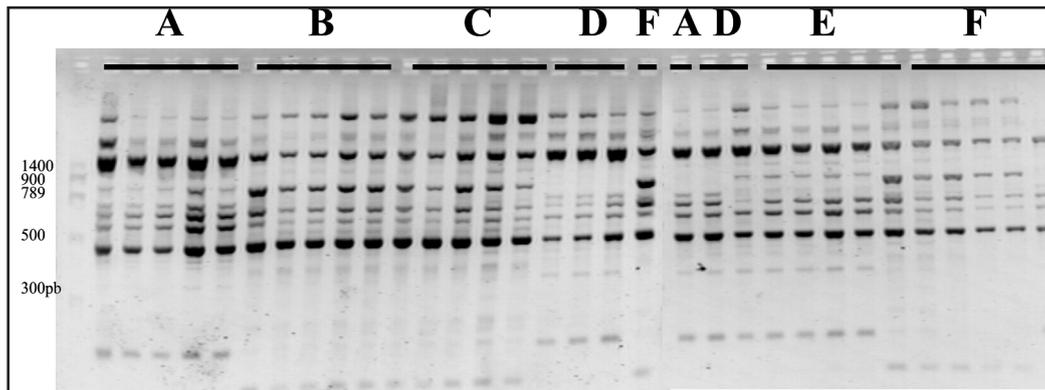


Figura 11 . Eletroforese em gel de agarose 2% da amplificação com um primer ISSR, de cultivares de feijão; experimento realizado em Viterbo.

Análise dos resultados

Abordagens metodológicas utilizadas no tratamento de dados gerados por RAPD e ISSR

Em princípio, marcadores RAPD e ISSR podem ser tratados como alelos mendelianos. O fato de esses marcadores serem do tipo dominante faz com que a análise das relações de parentesco entre organismos diploides não possa ser conduzida a partir do cálculo das frequências alélicas. Os dados de RAPD e ISSR são de natureza binária (presença ou ausência da banda) e requerem tratamento estatístico apropriado. Matrizes binárias são geradas, e a partir delas calculam-se coeficientes de similaridade.

Existem várias medidas de similaridade. Os coeficientes de similaridade de Dice e de Jaccard têm sido amplamente utilizados em análises de dados gerados via RAPD. Esses coeficientes de similaridade medem o grau de concordância entre duas unidades. O coeficiente de similaridade de coincidência simples é dado pela fórmula $S_{(SM)} = a + d/a + b + c + d$, enquanto o coeficiente de Jaccard pela fórmula, $S_{(J)} = a/a + b + c$. Essas estimativas são feitas comparando-se os indivíduos analisados dois a dois, por exemplo J e K. O valor de a corresponde ao número de bandas presentes nos dois indivíduos; b é o número de bandas presentes no indivíduo K, mas ausentes no indivíduo J; c é o número de bandas presentes n no indivíduo J, mas ausentes em K; d é o número de bandas ausentes em K e J. Portanto, a e d representam o número de concordâncias positivas e negativas, respectivamente, enquanto b e c representam as discordâncias. É necessário observar que o coeficiente de coincidência mede o grau de concordância entre as unidades, levando-se em conta as concordâncias negativas e positivas, enquanto o coeficiente de Jaccard desconsidera as concordâncias negativas (ANTONINI et al., 2004).

O processo de agrupamento envolve basicamente duas etapas: a primeira relaciona-se com a estimação de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre as unidades taxonômicas, e a segunda com a adoção de uma técnica de agrupamento, a formação do grupo (Figura 11).

Para facilitar o cálculo dos coeficientes de similaridade, deve-se construir uma matriz de dados, atribuindo-se valor um para a presença de banda a valor zero para a ausência de banda.

Quando o número de estimativas de medidas de similaridade é grande, torna-se difícil o reconhecimento de grupos homogêneos pela simples observação visual dessas estimativas. Os métodos de agrupamentos hierárquicos permitem que as unidades sejam agrupadas por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendrograma. Existem vários métodos de agrupamento disponíveis, e cabe ao pesquisador decidir qual o mais apropriado ao seu trabalho, uma vez que os diferentes métodos podem levar a diferentes padrões de agrupamentos.

No caso de análise de dados de RAPD e ISSR aplicados a estudos de variabilidade genética e de problemas taxonômicos, o método denominado UPGMA ("Unweighted pair-group method with arithmetical averages") tem sido bastante utilizado. Dependendo do número de unidades e variáveis (bandas), torna-se difícil a análise de agrupamento sem o uso da informática. Existem vários programas de computador que realizam esse tipo de análise. Um desses programas é o "Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs" (NTSYS), desenvolvido para auxiliar pesquisas em taxonomia numérica.

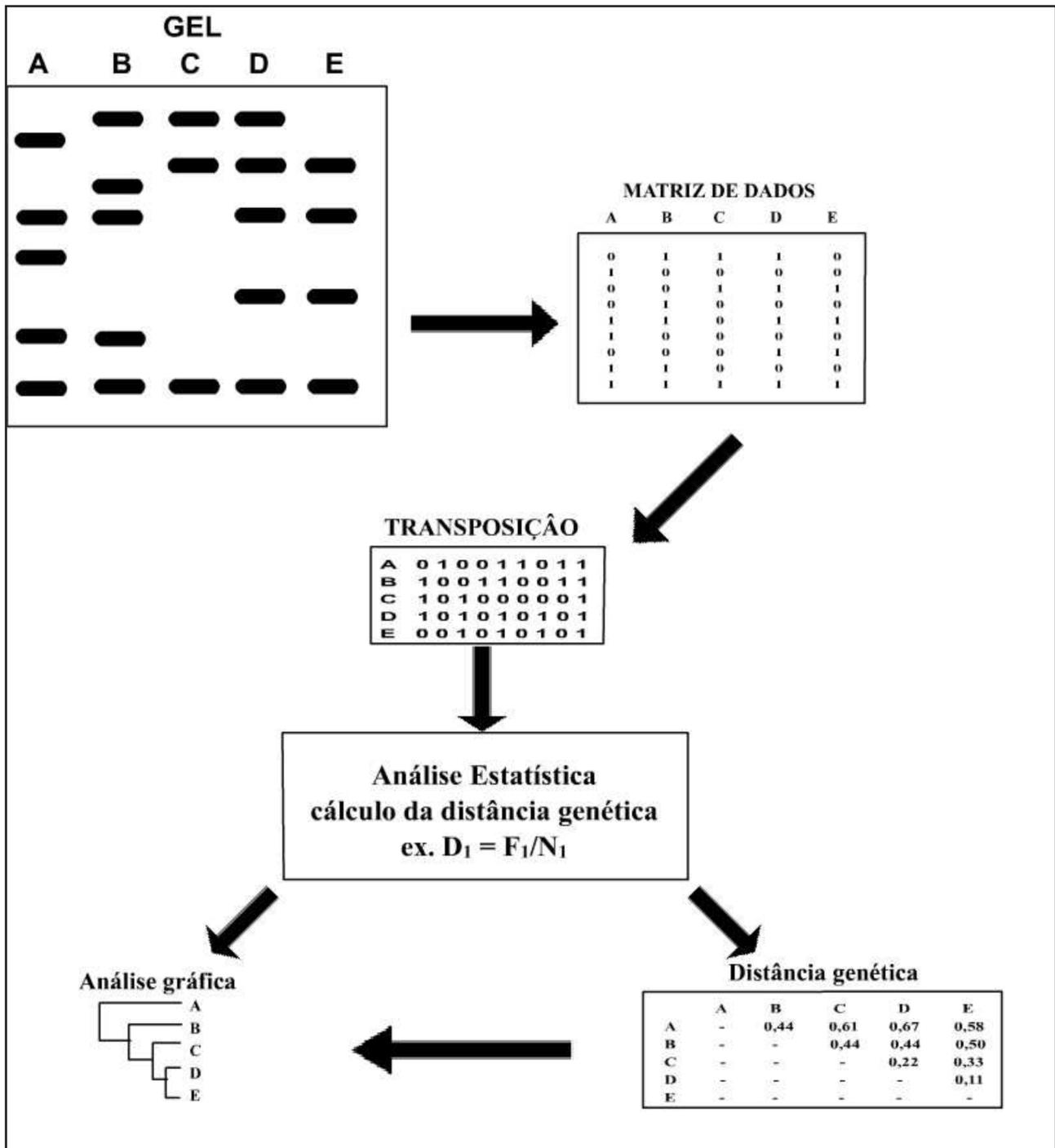


Figura 12. Análise do nível de diversidade genética e relacionamento genético. Os dados obtidos no gel são utilizados na geração de uma matriz de valores binários, constituída de acordo com a presença ou ausência de bandas de diferentes locos.

Abordagens metodológicas utilizadas no tratamento de dados gerados por SSR

Em princípio, marcadores SSR podem ser tratados como alelos mendelianos. O fato de esse marcador ser do tipo codominante faz com que a análise das relações de parentesco entre organismos diploides possa ser conduzida a partir do cálculo das frequências alélicas. Matrizes com a presença e o tamanho do alelo são geradas, e a partir delas calculam-se as frequências alélicas.

As distâncias genéticas entre os acessos são estimadas pela distância baseada em alelos compartilhados ("Shared Allele Distance"), que se baseia na soma da proporção de alelos comuns dividido pelo dobro do total de locos analisados ($D_{as} = 1 - P_{sa}$, com $P_{sa} = \sum s/S_r$) (JIN; CHAKRABORTY, 1993). Outras medidas de distância genética podem ser utilizadas, como, por exemplo, Rogers (1978) e Nei (1972), entre outras. Forma-se uma matriz diagonal de distâncias entre pares de indivíduos, populações e espécies, a qual é então submetida à análise de agrupamento pelo método UPGMA, descrito acima.

Referências

- AZEVEDO V. C. R.; VINSON C. C.; CIAMPI A. Y. Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl. (Sapotaceae), an Amazonian timber species. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 13-15, 2005.
- ANTONINI, S.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA A. S. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular**. São Carlos: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, 2004. 57 p.
- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V.; RANGEL, P. H. N.; FERREIRA, M. E. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interespecific cross *Oryza glumaepatula* X *O. sativa*. **Hereditas**, v. 134, p. 59-71, 2001.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 9, p. 816-827, 1998.
- BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 177-179, 2003.
- BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S; REIS, A. M. M; FERREIRA, M. E. Desenvolvimento de primers SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida. **Boletim Técnico da EMBRAPA/EPAGRI**, Brasília-DF, n. 15, p. 1-27, 2000.
- BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P.; BRONDANI, R. V.; MORETZSOHN, M. C.; BRONDANI, C.; FERREIRA, M. E. Development and characterization of simple repeat markers for *Phaseolus vulgaris*. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, 2001, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2001.
- CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba)-Leguminosae-Caesalpinioideae e otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco. **Boletim de Pesquisa**. Brasília, DF: Embrapa, n. 16, p. 1 - 40, 2000.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Notes**, v. 8, p. 1-4, 2008.
- COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, p. 748-756, 1999.

- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306, 2001.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 205-227.
- GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for Heart of Palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**, v. 1, n. 1-2, p. 86, 2000.
- GARRIDO, L. R. **Identificação, desenvolvimento e uso de marcadores de regiões hipervariáveis do genoma de *Magnaporthe grisea* na análise da estrutura de populações do patógeno infectando plantações de arroz (*Oryza sativa*)**. Brasília, DF: UnB, 2001. 386 p. (Tese de Doutorado).
- GIANFILIPPI, F. **Studio della diversità molecolare in popolazioni locali italiane di lenticchia (*Lens culinaris* Medik) tramite marcatori**. Tuscia: Università degli studi della Tuscia, 2006. Tesi de láurea Agrária.
- GONZALES, A.; WONG, A.; DELGADO-SALINAS, A.; PAPA, R.; GEPTS, P. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. **Crop Science**, v. 45, p. 606-615, 2005.
- GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, p. 163-185, 2000.
- JIN, L.; CHAKRABORTY, R. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 120-127, 1993.
- KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. Porto Alegre, RS: ARTMED, 2002. 434 p.
- LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 287-290, 2002.
- MILLACH, S. C. K; Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 5, p. 14-17, 1998.
- MORETZSOHN, M. de C.; COELHO, P. J. A.; AMARAL, Z. P. de S.; HERCOS, A. P.; TUPINABA, E. A. Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites na análise da variabilidade genética de ecótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 25 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 16).
- MORETZSOHN, M. de C.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; VALLS, J. F. M.; FERREIRA, M. E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biology**, v. 4, n. 11, 2004.
- MORETZSOHN, M. de C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P. M.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; GIMENES, M. A.; MARTINS, W. S.; VALLS, J. F. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTIOLI, D. J. A microsatellite based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1060-1071, 2005.
- POWEL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J. M.; TINGEY, S. V.; RAFALSKI, J. A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B., LAI, E. (Ed.). **Analysis of non-mamalian genomes: a practical guide**. New York: Academic Press, p. 75-134, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, v. 1-3, 2001.

SICARD, D.; NANNI, L.; PORFIRI, O.; BULFON, D.; PAPA, R. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. **Plant Breeding**, v. 124, p. 464-472, 2005.

VINSON, C. C.; AZEVEDO, V. C. R.; SAMPAIO, I.; CIAMPI, A. Y. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet.) a tree species from the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, Loughborough, U. K., v. 5, n. 1, p. 33-34, 2005a.

VINSON, C. C.; AMARAL, A. C.; SAMPAIO, I.; CIAMPI, A. Y. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Symphonia globulifera* Linn.f, an tropical tree. **Molecular Ecology Notes**, Loughborough, U. K., v. 5, p. 202-204, 2005b.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

Anexos

Anexo 1. Segurança no Laboratório

Durante a execução dos experimentos, trabalha-se com reagentes potencialmente perigosos e diversos equipamentos, sendo necessária a adoção dos seguintes procedimentos de segurança no laboratório:

1. É proibido comer, beber, fumar, estocar alimentos e usar cosméticos no laboratório.
2. Devem ser utilizados sapatos adequados, fechados, e com sola não deslizante em todas as áreas do laboratório.
3. Cabelos longos devem estar presos.
4. Jalecos devem ser utilizados para a proteção contra contaminação ou danos às roupas. Eles devem ser removidos ao deixar as áreas do laboratório para evitar transferência de contaminantes do laboratório para as áreas normalmente limpas (como escritórios, copas, etc.).
5. As mãos devem ser lavadas depois da retirada das luvas, antes de deixar o laboratório, e a qualquer tempo depois do manuseio de materiais tidos como suspeitos de contaminação.
6. A proteção da face e dos olhos (utilizando-se óculos, visores ou outros equipamentos de proteção) deve ser feita para evitar o impacto de objetos, substâncias prejudiciais, luz ultravioleta ou outras radiações.
7. É proibido pipetar qualquer substância com a boca.

Disposição de resíduos perigosos

Resíduos orgânicos

Solventes orgânicos, como clorofórmio e álcool isoamílico, não devem ser despejados na pia. A maioria dos materiais contaminados com solventes orgânicos deve ser acondicionada em um recipiente reforçado. Quando estes recipientes estiverem cheios, devem ser encaminhados ao serviço de coleta especializado.

Brometo de etídio

Os materiais contaminados com brometo de etídio (luvas, ponteiros, tubos e géis) devem ser acondicionados em um recipiente reforçado e identificados como resíduos orgânicos. A disposição de solução de brometo de etídio com concentração inferior a 0,5 ug/mL pode ser feita após exposição a luz por vários dias.

OBS.: os géis devem ser descartados em lixeira própria, devidamente identificada.

Outras soluções

Soluções não perigosas solúveis em água podem ser despejadas na pia.

Anexo 2. Preparo de Soluções

Soluções para extração de DNA

Solução estoque de Tris-HCl 1 M

A solução foi preparada dissolvendo-se 121,10 g de Trizma base (Tris – Hidroximetil amino metano – Sigma: T-1503) em aproximadamente 800 mL de água bidestilada (Milli-Q). O pH foi ajustado para 8,0 (ou 7,5, quando necessário), com HCl concentrado (aproximadamente 40 mL) e o volume final completado para 1000 mL com água bidestilada. A solução foi distribuída em frascos (100 mL por frasco), os quais foram esterilizados e estocados sob temperatura ambiente.

Solução estoque de NaCl 5 M

A solução foi preparada dissolvendo-se 292,24 g de NaCl em 1000 mL de água bidestilada (q.s.p.). A solução foi distribuída em frascos (100 mL por frasco), os quais foram esterilizados e estocados sob temperatura ambiente.

Solução estoque de EDTA 0,5 M (pH 7,5 ou 8,0)

A solução foi preparada dissolvendo-se 186,10 g de EDTA (Sigma: E-5134) em 800 mL de água bidestilada e titulada com NaOH sólido (aproximadamente 20,00 g) até atingir o pH desejado (7,5 ou 8,0). Após a dissolução completa do EDTA, o volume foi completado para 1000 mL com água bidestilada. A solução foi distribuída em frascos de 100 mL, os quais foram esterilizados e estocados sob temperatura ambiente.

SDS 10% (detergente)

A solução foi preparada dissolvendo-se 10 g de SDS em aproximadamente 80 mL de água bidestilada aquecida. Após a dissolução completa do SDS, a solução foi resfriada e o volume completado para 100 mL com água bidestilada. A solução foi estocada sob temperatura ambiente, não sendo necessária a esterilização.

OBS.: o SDS precipita ao ser colocado em refrigerador.

TRIS HCl 0,5 M Ph 8,0 - Diluiu-se a solução de TRIS-HCl 1 M pH 8,0 em água bidestilada na proporção de 1:1.

TRIS HCl 0,1 M pH 8,0 - Diluiu-se a solução de TRIS-HCl 1 M pH 8,0 em água bidestilada na proporção de 1:10.

Clorofane

Este foi obtido a partir da mistura de um volume de fenol a aproximadamente um volume de clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1).

ETANOL 70%

Álcool Etílico.....342 mL

Água destilada.....58 mL

Tampão Tris-EDTA (TE)

TRIS-HCl 1M pH 7,5.....10 mL

EDTA 0,5M pH 8,0.....2 mL

O volume foi completado para 1000 mL com água bidestilada e a solução esterilizada.

RNase

A RNase pancreática (RNase A) foi preparada na concentração de 10 mg/mL, em 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 15 mM de NaCl. A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C durante 15 minutos e estocada a -20°C.

Tris-HCl 10 mM = Tris-HCl 0,01 M

Tris-HCl 1 M = Tris-HCl 0,01 M

Para diluir 100X: 1 mL de Tris-HCl 1 M + 99 mL de água bidestilada

NaCl 15 mM = NaCl 0,015 M

Na Cl 1 M = 58,45 g

NaCl 0,015 = 0,877 g em 1000,00 mL = 0,00877 g de NaCl em 10 mL de Tris-HCl 0,01 M

0,01 g de RNase em 1 mL de solução Tris-HCl/NaCl

Soluções para eletroforese

Solução estoque de brometo de etídio (10 mg/mL)

Dissolver 1% (p/v) de brometo de etídio em água destilada durante 1 hora, sob agitação constante. Estocar em frasco âmbar sob temperatura ambiente ou em refrigerador. No momento do uso, adicionar 3 µL desta solução a 100 mL de tampão TBE 1X.

Brometo de etídio: 1% = 1g em 100 mL de água destilada (concentração final: 0,01 g/mL ou 10 mg/mL). Em 1 mL de água destilada, tem-se 0,01 g ou 10 mg de brometo de etídio.

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) – 10X (Tampão de Corrida)

Trisma base.....108 g

Ácido Bórico.....55 g

EDTA 0,5 M (pH 8,0).....40 mL

Acertar o volume para 1000 mL com água destilada, deionizada e filtrada em filtro Milli-Q. Autoclavar o tampão e estocar a 4°C. No momento do uso, fazer a diluição com água Milli-Q para a obtenção da concentração desejada (0,5X ou 1,0X).

TBE 1X = Diluir o tampão TBE 10X na proporção de 1:10 em água Milli-Q.

1 volume de tampão TBE 10X: 9 volumes de água Milli-Q.

100 mL de tampão TBE 10X: 900 mL de água Milli-Q.

200 mL de tampão TEB 10X: 1800 mL de água Milli-Q.

Tampão de amostra

Preparar este tampão a partir de uma solução de glicerol 30% em água destilada, adicionar azul de bromofenol (0,25%) e estocar a solução final em refrigerador. No momento de uso, adicionar um volume deste tampão (equivalente a 10% do volume da amostra a ser aplicada) ao volume correspondente da amostra. Ambos são homogeneizados e aplicados nos poços do gel de agarose com uma micropipeta.

Exemplo:

Volume da amostra a ser aplicada no gel de agarose: 20 μ L.

Volume do tampão de amostra: 2 μ L.

Gel de agarose 0,8% (para verificar a integridade do DNA)

Agarose (Sigma A-0169/Pharmacia/GIBCO).....0,8 g

TBE 1X.....100 mL

Pesar a agarose em um Erlenmeyer e adicionar o volume adequado do tampão TBE 1X. Ferver no microondas durante aproximadamente 3 minutos (ou mais) na potência média, pausando a cada 30 segundos e agitando levemente o frasco, a fim de homogeneizar a agarose.

Após a completa dissolução, resfriar a agarose até 50-60°C, adicionar o brometo de etídio e vertê-la sobre a cavidade da cuba de eletroforese. Posicionar adequadamente o pente no aparato para a formação dos poços. Deixar a agarose polimerizar durante aproximadamente 30 minutos sob temperatura ambiente.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***