

Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites

Introdução

Os marcadores moleculares podem ser derivados de qualquer tipo de dado molecular, que forneça um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados. Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análise genética de várias situações como na identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, na estimativa de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos. Devido ao desenvolvimento no campo da biologia molecular aliada à genética, uma grande variedade de técnicas para analisar polimorfismos genéticos tem sido disponibilizada. Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro.

O genoma dos eucariotos contem seqüências repetitivas que podem ser usadas como marcadores de DNA. As seqüências simples repetidas SSR ("sequence simple repeats") ou STMS ("sequence tagged microsatellite site") ou microssatélites são um dos marcadores mais polimórficos encontrados hoje nos genomas de animais e plantas. Marcadores SSR são caracterizados por uma seqüência de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, que pode estar repetida em tandem. Estas repetições surgem provavelmente de "escorregões" na replicação do DNA, recombinação desigual ou alinhamento incorreto das fitas de DNA. O polimorfismo alélico ocorre em um loco SSR devido a mudanças no número de repetições. Estes polimorfismos são detectados por uma amplificação de DNA usando "primers" que flanqueiam as repetições e os produtos da amplificação são visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV e/ou poliacrilamida corado com nitrato de prata ou visualização através de marcação com fluorescência e laser.

Os microssatélites apresentam numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores (RFLP, RAPD, AFLP, etc): eles 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 radioatividade; estão bem dispersos no genoma, em regiões codificadoras e não codificadoras; os locos são freqüentemente conservados entre espécies relacionadas.

Estudos em Bancos de Dados mostram que a freqüência e distribuição dos microssatélites difere 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 freqüência 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 freqüência de SSRs (1 por 317 Kb) (Wang *et al.*, 1994). Os microssatélites estão presentes em regiões codificadoras e não codificadoras. (Zane *et al.*, 2002).

A maior limitação na utilização deste tipo de marcadores está na grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento dos mesmos. O Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem desenvolvido marcadores SSR para várias espécies através de um protocolo otimizado pela Dupont (Rafalski *et al.*, 1996), utilizando bibliotecas enriquecidas, adaptado para nossas condições. Já foram desenvolvidos "primers" para eucalipto (Brondani, *et al.*, 1998), pequi (Collevatti *et al.*, 1999), pimentas e pimentões (Buso *et al.*, 2000), feijão (Buso *et al.*, 2001), copaíba (Ciampi, *et*

Brasília, DF
Setembro, 2003

Autores

Gláucia Salles
Cortopassi Buso

Ana Yamaguichi
Ciampi.

Bióloga, PhD, Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia –
aciampi@cenargen.embrapa.br

Márcio de Carvalho
Moretzsohn

Zilneide Pedrosa de
Souza Amaral

al., 2000), palmito (Gaiotto, *et al.*, 2000), mogno (Lemes, *et al.*, 2002), arroz (Brondani, *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (Garrido, 2001), coco (Moretzsohn, *et al.*, 2001), sumaúma, cedro, pau-brasil, jatobá, melão, cumaru, parapará, tatajuba, andiroba, ananí e maçaranduba (não publicados), Visto que o laboratório tem grande experiência no desenvolvimento de “primers” SSR, que este protocolo foi utilizado com sucesso para um grande número de organismos e que este tipo de marcador é um dos mais informativos disponíveis, o protocolo será detalhado a seguir.

1- Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR:

a- Extração de DNA genômico:

O desenvolvimento de marcadores SSR, requer uma quantidade mínima de DNA de 50 mg de boa qualidade. Para a extração de DNA na grande maioria das espécies vegetais, tem sido utilizado o protocolo com o detergente CTAB (“cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide”), como descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998). Pequenas adaptações neste protocolo são geralmente necessárias, dependendo da espécie em questão.

Após a extração, é feita a quantificação de DNA, em gel de agarose (a 1%), por comparação com padrões de DNA em concentrações conhecidas.

b- Digestão do DNA genômico:

Teste de digestão do DNA com enzimas de restrição, para as quais já se tenha adaptador com a seqüência de corte (Anexo 2). A digestão deve ser tal que possibilite a obtenção de fragmentos entre 300 e 800 pb.

A reação de digestão é feita de acordo com as instruções do fabricante. Por exemplo, para as enzimas *Sau3AI* e *MseI*, é feita uma incubação a 37 °C, por 12 h, enquanto para *Tsp509I*, a incubação é feita a 65°C, por 12 h. Utilizam-se 5U dessas três enzimas para cada µg de DNA.

As reações de digestão são visualizadas em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Nesta etapa seleciona-se a enzima que apresenta digestão total, com mais fragmentos de 300 a 800 pb de comprimento. (Colocar 3 µl de tampão de carregamento na reação, que é carregada toda no gel. Colocar 8 ml de padrão 1 kb no gel).

c- Após a seleção da enzima, fazer uma reação de digestão para 50 mg de DNA, seguindo as instruções do fabricante. De maneira geral, esta reação é feita da seguinte maneira:

| | |
|-----------------------------|---------------------|
| DNA | 50 µg |
| Tampão 10X da enzima | 20 µl |
| Enzima | 5U / µg de DNA |
| H₂O | completar p/ 200 µl |
| Total | 200 µl |

d- Recuperação dos fragmentos de tamanho entre 300 e 800 pb em membrana de celulose (DEAE-celulose NA-45), via eletroforese.

d.1- Preparo da membrana, para aumentar a capacidade de ligação ao DNA

- Lavar a membrana por 10 min. em 10 mM EDTA, pH 7,6;

- Lavar a membrana por 5 min. em 0.5 M NaOH;

- Lavar a membrana várias vezes em água destilada;

- A membrana pode ser armazenada em água destilada a 4 °C, por semanas.

d.2- Eletroforese: preparar o gel de agarose a 2% em TBE 1X, de aproximadamente 2 cm de espessura. Unir 3 dentes do pente com fita crepe (deixar dois dentes, unir três e deixar mais dois). Colocar 10 ml de brometo de etídio (1 mg/ml) para cada 50 ml de gel. Aplicar no primeiro poço do gel 15 µl de DNA padrão 1 kb, pular o segundo poço e aplicar toda a reação de digestão com 80 ml de tampão de carregamento (total de 280 µl) no poço originado pela união dos três dentes. A eletroforese deve ser mantida até que os fragmentos de DNA padrão de 1 kb estejam bem separados (os fragmentos devem estar entre 200 e 1000 pb) (Figura 1). Descartar todo o gel acima de 800 pb e fazer um corte (fenda) acima do azul de bromofenol no gel ou na altura do marcador de 200 pb, para introduzir a membrana. Cortar a membrana DEAE-celulose NA-45, previamente preparada, da mesma largura da migração dos fragmentos (comprimento do poço) e mesma espessura do gel. Colocar a membrana na fenda e continuar a eletroforese por duas horas, a 100 V. Antes de tirar a membrana, verificar se todos os fragmentos migraram em direção à membrana no transiluminador UV.

e- Precipitação dos fragmentos recuperados na membrana - DEAE-celulose NA-45.

Preparar:

| | |
|---------------------|-------------------|
| Tampão NET : | 0,15 M NaCl |
| | 0,1 mM EDTA |
| | 20 mM Tris pH 8,0 |

Tampão High Salt (HS) NET: 1,0 M NaCl
0,1 mM EDTA
20 mM Tris pH 8,0

- Lavar a membrana, contendo os fragmentos de DNA em tampão NET.
- Colocar a membrana ainda molhada, cortada em tiras de 0,3 cm em um microtubo de 1,5 ml. Adicionar 500 µl de tampão HS NET. Centrifugar por 5 segundos para submergir a membrana, e então incubar a 65 °C, por uma hora.
- Remover o tampão em um novo microtubo de 2,0 ml. Adicionar 2,5X o volume do tampão de etanol absoluto.
- Incubar por 12 h, a -20 °C.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 15 min. Retirar a membrana e lavar o "pellet" duas vezes com etanol 70%, por 5 min. cada vez.
- Secar o "pellet" e ressuspender em 50 µl de H₂O MilliQ esterilizada.

ALTERNATIVA PARA RECUPERAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE 300-800 pb:

Os passos **d1**, **parte do d2** e **e** podem ser substituídos, utilizando-se um kit de extração da QIAGEN (Qiaquick Gel Extraction Kit). Após o procedimento de eletroforese descrito no passo **d2**, retirar a faixa do gel contendo os fragmentos entre 200-800 pb e prosseguir conforme as instruções contidas no kit, que são, resumidamente:

- Recuperar os fragmentos de géis de aproximadamente 500 mg e colocar em microtubos de 2 ml;
- Adicionar o volume de tampão QG do kit 3x o peso do gel (500 mg – 1500 µl);
- Incubar a 50 °C, agitando pelo menos uma vez; deixar até que o gel derreta;
- Filtrar a solução na coluna QIAquick, centrifugando por 10 segundos, a 13000 rpm, cada 750 µl até terminar a solução (tampão QG com gel dissolvido);
- Colocar 750 µl da solução PE do kit e manter por 5 min. Centrifugar duas vezes por 2 min a 13000 rpm, removendo o filtrado do tubo após cada centrifugação;
- Colocar a coluna em microtubo de 1,5 ml, para recuperar os fragmentos de 300-800 pb em 30 µl de H₂O MilliQ esterilizada;

f- Quantificação e confirmação do tamanho dos fragmentos recuperados. Aplicar 3 µl do DNA recuperado, em gel de agarose a 2%, ao lado de um DNA com concentração conhecida. A eletroforese é feita por 30 minutos a 100 V.

g- Ligação dos adaptadores: cada adaptador contém um sítio de *EcoRI*. "Short primers" são usados para amplificação de DNA de fita simples, após o enriquecimento. Os produtos da amplificação, de fita dupla, são digeridos com *EcoRI* e clonados.

g.1- Preparo dos adaptadores (concentração final: 200 µM):

| | |
|-------------------------------|--------|
| Short Adaptor (500 µM) | 80 µl |
| Long Adaptor (500 µM) | 80 µl |
| TE + 0,1 M NaCl | 40 µl |
| Total | 200 µl |

- Incubar por 15 min. a 65 °C

- Manter por 2 h, a temperatura ambiente

- Armazenar a 4 °C

g.2- Ligação dos fragmentos recuperados aos adaptadores com extremidades coesivas às geradas pela enzima selecionada (proporção de 10 adaptadores (200 µM): 1 DNA ou 5-10 µg DNA: 40-80 pM de extremidades).

| | |
|--|--------|
| Adaptadores (200 µM) | 4 µl |
| DNA (5-10 µg) | 50 µl |
| Tampão 10X T₄ DNA ligase | 12 µl |
| T₄ DNA ligase (400 U/µl) | 6 µl |
| H₂O | 48 µl |
| Total | 120 µl |

- Incubar por 12 h a 12 °C.

h- Ligação de oligonucleotídeos a biotina. Usaremos como exemplo o enriquecimento para repetições TC. Neste caso, usa-se o oligo (TC)₁₃.

| | |
|---|---------|
| (TC)₁₃ (100 pmoles/ml) | 2,0 µl |
| Tampão 10X da terminal transferase | 4,0 µl |
| Biotin – 16 ddUTP (25 nmol) | 2,0 µl |
| Terminal Transferase (15U/ml) | 5,3 µl |
| H₂O | 26,7 µl |
| Total | 40,0 µl |

- Incubar a 37 °C por 30 min.

· Paralisar a atividade enzimática, adicionando 4 ml de 0,5M EDTA

- Precipitar com 2,5 volumes de etanol 100%, por 12 h.

- Centrifugar a 12.000 rpm, por 30 min.
 - Lavar uma vez com etanol 70% e secar o “pellet” na bancada ou em Speed Vac.
 - Ressuspender em 30 µl de H₂O.
- i- Preparo das contas magnéticas (Dynabeads - Streptavidin) e adição do complexo biotina - oligo(TC)₁₃:
- Adicionar 100 µl de contas a 10 mg/ml para cada hibridização, em um microtubo de 2 ml (retire o líquido que vem com as contas).
 - Lavar duas vezes em 400 µl de tampão PBS 1% BSA (Sambrook, 1989 vol.3-B.12). Acoplar o tubo no separador de contas (acessório magnetizado, espécie de um ímã que atrai as contas, da Dynal) e remover a solução aquosa com micropipetador (P1000), evitando retirar as contas magnéticas.
 - Lavar uma vez com BW 1X (Tris HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 2 mM). Remover a solução com o auxílio do separador de contas.
 - Adicionar 200 µl de BW 2X e 170 µl de H₂O.
 - Adicionar 30 µl da biotina ligada ao oligo (TC)₁₃ (do passo c).
 - Deixar a temperatura ambiente, sob agitação, por uma hora.
 - Lavar duas vezes com 400 µl de BW 1X. Remover a solução com o auxílio do separador de contas.
 - Lavar uma vez com 400 µl de SSC (Standard Saline Citrate) 5 X com SDS 0,1%. Remover a solução com o auxílio do separador de contas. Prepara SSC 20X: Pesar 175,3 g de NaCl, 88,2 g de citrato de sódio. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH (aproximadamente 6,5 ml de uma solução 10 N) e o volume para 1 litro com H₂O.
 - Ressuspender em 150 ml de SSC 10X com SDS 0,2% pré-aquecido a 65 °C.
 - Incubar por 15 min a 65 °C.
 - Estocar a 4 °C.
- j- Hibridização do DNA-alvo + adaptador ao complexo oligo-contas magnéticas.
- Transferir todo o volume de 120µl do DNA +

adaptador (passo b) para um tubo de 1,5 ml e adicionar 30 ml de H₂O.

- Fazer uma diluição 1:1000 do DNA + adaptador (Reservar para PCR).
 - Desnaturar os 150 µl do DNA + adaptador a 95 °C por 15 min e colocar imediatamente em gelo.
 - Transferir todo o volume de DNA + adaptador desnaturado (150 µl) para o tubo contendo o complexo oligo-contas magnéticas (passo d) e incubar a 65 °C por 90 min., agitando a cada 10 min.
 - Recuperar a solução de hibridização com o auxílio do separador de contas magnéticas em um tubo (reservar para PCR).
- k- Lavagens e ressuspensão da biblioteca genômica enriquecida.
- Lavar duas vezes por 5 min. com 400 ml de SSC 2X + SDS 0,1%. Recuperar as soluções em cada lavagem, deixando as contas magnéticas ligadas à biblioteca genômica enriquecida no tubo, com o auxílio do separador de contas magnéticas. Identificar os tubos como 1ª e 2ª lavagem (reservar para PCR).
 - Lavar uma vez com 400 µl de SSC 2X + SDS 0,1% por 15 min. a 65 °C. Recuperar a solução – 3ª lavagem (reservar para PCR).
 - Enxaguar uma vez com 400 µl de SSC 2X e recuperar a solução de enxágüe (reservar para PCR).
 - Ressuspender as contas ligadas à biblioteca genômica enriquecida em 200 µl de H₂O MilliQ esterilizada.

l- PCR para controle do enriquecimento da biblioteca genômica, utilizando “primers” complementares às seqüências dos adaptadores e sete amostras de DNA:

| | Reação (µl) | Coquetel para 8 reações (µl) |
|---|-------------|------------------------------|
| DNA (Template) | 2,0 | 2,0 ml de cada |
| Tampão 10X + MgCl₂ 1,5 mM | 2,5 | 20,0 |
| Primer (10 µM) | 2,5 | 20,0 |
| DNTP (2,5 mM) | 2,5 | 20,0 |
| Taq DNA polimerase (5U / µl) | 0,2 | 1,6 |
| H₂O MilliQ esterilizada | 15,3 | 122,4 |
| Total | 25,0 | 200,0 |

Em cada reação colocar o DNA das soluções:

- 1:1000 diluição do DNA + adaptador
- solução de hibridização
- solução da primeira lavagem
- solução da segunda lavagem
- solução da terceira lavagem
- solução de enxágüe
- biblioteca genômica enriquecida ligada às contas magnéticas.

Programa da PCR:

| | |
|-------|-------|
| 95 °C | 3 min |
| 94 °C | 2 min |
| 72°C | 7 min |

94 °C por 45 seg.; 56 °C por 45 seg; 72 °C por 2 min – repetir 20 a 25 ciclos

- Adicionar 5 µl de tampão de carregamento em cada reação e aplicar o volume total em gel de agarose a 2%. Eletroforese a 80 V por 30 a 40 minutos. Reservar o gel para transferência do DNA amplificado para a membrana - "Southern Transfer".

a- "Southern Transfer" - Transferência do DNA para a membrana, para hibridização com a sonda AG/TC e verificação do enriquecimento da biblioteca genômica.

- Desnaturar o gel com solução desnaturante por 3 min., à temperatura ambiente sob agitação.

Solução Desnaturante: 0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

- Lavar rapidamente em água destilada.

- Neutralizar o gel com solução neutralizante por 30 min., à temperatura ambiente sob agitação.

Solução Neutralizante: 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)
1,5 M NaCl

- Montar o "sanduíche" com o gel, membrana de transferência e papéis de filtro, da seguinte forma:

1- Colocar 500 ml de SSC 10X em uma bandeja de transferência, com uma placa de vidro sobre a bandeja, atravessando transversalmente, deixando espaço nas extremidades da bandeja.

2- Cobrir a placa de vidro com papel de filtro Whatman 3MM, com as extremidades em contato com a solução SSC 10X.

3- Colocar o gel sobre o papel de filtro.

4- Colocar a membrana de hibridização (Hybond – N) do mesmo tamanho do gel, com devida identificação no lado em contato com o gel.

5- Depositar algumas folhas de papéis de filtro Whatman 3 e algumas folhas de papel filtro do mesmo tamanho do gel sobre a membrana.

6- Colocar uma pilha de aproximadamente 10 cm de papel toalha do mesmo tamanho do gel

7- Colocar uma placa de vidro e um peso, de cerca de 500 g sobre tudo.

8- Deixar por 12 h ou até que a solução SSC 10X da bandeja seja transferida para parte da pilha de papel toalha.

- Lavar a membrana duas vezes, por 10 min. cada vez, com 2X SSC sob agitação.

Deixar secar, à temperatura ambiente, sobre papel de filtro (duas horas) e fixar o DNA às membranas através de luz Ultra Violeta ("crosslinker").

b- Hibridização do DNA imobilizado na membrana com sondas AG/TC, para confirmar o enriquecimento da biblioteca genômica:

- Pré-hibridização: colocar a membrana no frasco de hibridização com 50 ml de tampão de hibridização e acoplar o frasco no carrossel do forno de hibridização por 3 h, à 65 °C (para manter girando).

Tampão de hibridização (Standard Hybridization Buffer): para 500 ml

SSC 5X 125 ml do estoque 20X

0,1% N-laurylsarcosine 0,5 g

0,02% SDS 0,1 g

1% "Blocking reagent" 5 ml do estoque 10X

H₂O Completar para 500 ml

· Hibridização: Substituir a solução da pré-hibridização por 50 ml de solução de hibridização, acrescida de sonda AG/TC. Retornar ao forno de hibridização, mantendo sob agitação por 12 h, à 65 °C. A sonda é composta por oligo (AG)₁₃ e (TC)₁₃, marcada com digoxigenina e pode ser sintetizada devidamente marcada ou pode-se marcá-la utilizando-se o kit Random Primer, conforme o protocolo indicado pelo fabricante.

Preparo da sonda:

Adicionar 5 µl da sonda AG/TC do estoque 100ng/ml em 45 ml de H₂O MilliQ esterilizada, desnaturar por 10 min a 95 °C e colocar no gelo. Colocar em 50 ml de tampão de hibridização (Standard Hybridization Buffer). Esta sonda com tampão pode ser reutilizada, portanto armazenar a -20 °C e, a cada uso, desnaturar por 20 min a 95 °C.

c- Lavagens pós-hibridização

· Lavar duas vezes, por 5 min. em SSC 2X + SDS 0,1%, à temperatura ambiente. Volume da solução deve ser 1 ml por cm² de membrana.

Para 400 ml:

| | |
|---------|-------|
| SSC 20X | 40 ml |
| SDS 10% | 4 ml |

· Lavar duas vezes, por 15 min. em SSC 0,1 + SDS 0,1% pré aquecida a 65 °C e incubar a 65 °C, sob constante agitação.

Para 400 ml:

| | |
|---------|------|
| SSC 20X | 2 ml |
| SDS 10% | 4 ml |

d- Detecção da hibridização por quimioluminescência por CSPD (Dig Luminescent Detection Kit)

· Lavar a membrana por 5 min. com tampão de lavagem (1 ml/ cm² de membrana).

Tampão de lavagem:

Tampão ácido maléico (Tampão 1) + 0,3% (v/v) Tween 20

| | |
|----------|--------|
| Tween20 | 750 µl |
| Tampão 1 | 250 ml |

Tampão ácido maléico (Tampão 1)

0,1 M ácido maléico
0,15 M NaCl
Ajustar o pH para 7,5 com NaOH

· Incubar por 30 min em 100 ml do tampão 2 (volume para duas membranas de 14cm de diâmetro).

Tampão 2 : "blocking solution" 1X

Diluir a solução estoque de "blocking solution 10X" para 1:10 em tampão ácido maléico (Tampão 1):

45 ml do tampão 1 + 5 ml "blocking solution 10X"

"Blocking Solution 10X" :

| | |
|---|-------|
| "Blocking reagent" | 5 g |
| Tampão 1 "Buffer 1" | 50 ml |
| Esterilizar em autoclave (agitar ainda quente). | |

· Incubar a membrana por 30 min. em 25 ml de "antibody solution". Se tiver mais do que uma membrana, elas devem ser sempre trocadas de posição.

"Antibody Solution"

Diluir anti-DIG-AP conjugate (vial 3) em 75mU/ml, no tampão 2

2,5 ml de anti-DIG em 25 ml de tampão 2

· Lavar a membrana duas vezes, por 15 min., em 100 ml de tampão de lavagem "washing buffer" (volume para duas membranas de 14cm de diâmetro).

· Equilibrar a membrana, por 5 min., em 20 ml de tampão 3.

Tampão 3:

0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
50 mM MgCl₂
Ajuster pH para 9,5 (20 °C)

· Diluir CSPD (vial 5) 1:100 no tampão 3 (130 µl em 13 ml). Colocar, com uma pipeta P1000, 1 ml da solução, somente em cima da membrana (14 cm de diâmetro), procurando distribuir bem. O CSPD diluído pode ser armazenado a 4 °C no escuro e pode ser reutilizado por uma a duas vezes.

· Incubar a membrana selada, por 5 min., a 37 °C.
Selagem: esticar bem um pedaço de filme de PVC (zap), enxugar o lado oposto da membrana com papel de filtro e colocar o lado molhado em contato com o zap. Cortar outro pedaço de zap e colocar bem esticado em cima da membrana. Colar um zap no outro e recortar as sobras no formato da membrana.

· Colocar a membrana para expor em filme de auto-radiografia de raio-X, por 4 h, a 37 °C.

· Revelar de acordo com revelador de filme (Figura 1).

e- Amplificação do DNA da biblioteca genômica enriquecida ligada às contas magnéticas:

| | Reação (µl) | Coquetel para 36 reações (µl) |
|--|-------------|-------------------------------|
| DNA + contas | 2,0 | 72,0 |
| Tampão 10X + MgCl ₂ 1,5 mM | 2,5 | 90,0 |
| *Primer (10 µM) | 2,5 | 90,0 |
| dNTP (2,5 µM) | 2,5 | 90,0 |
| Taq DNA polimerase (5U/µl) | 0,2 | 7,2 |
| H ₂ O MilliQ esterilizada | 15,3 | 550,8 |
| Total | 25,0 | 900,0 |

*Primer complementar à região de corte da enzima

f- Purificação do DNA amplificado para clonagem do inserto (DNA enriquecido).

· Juntar as 32 reações em um único tubo. Retirar uma alíquota de 3 µl para fazer o gel de quantificação (2%), para verificar se amplificou bem.

· Retirar as amplificações em dois tubos (400 µl em cada), separando-se as contas magnéticas com auxílio do acessório magnetizado.

· Purificar as reações utilizando Kit "GFX™ DNA and Gel Band Purification" ou kit de purificação de PCR Qia-quick (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

· Quantificar as reações em gel de agarose a 2% comparando com DNA já quantificado. Quantidade mínima esperada de 100 ng/µl, pois serão utilizados 2 µl, contendo 200 ng. Se não tiver DNA suficiente, amplificar mais.

1- Clonagem do inserto com SSR (DNA genômico enriquecido)

a- Reação de ligação do DNA enriquecido e purificado ao vetor pGMET (Kit Promega pGMET Vector Easy System).

· Reação de ligação: o DNA é diretamente ligado ao plasmídeo, utilizando-se a enzima T₄ DNA ligase:

| | |
|--------------------------------------|-------|
| Tampão 10X T ₄ DNA ligase | 1 µl |
| T ₄ DNA ligase | 1 µl |
| Vetor pGMET | 1 µl |
| H ₂ O | 5 µl |
| Total | 10 µl |

Incubar a 4 °C, por 12 h

b- Transformação por choque térmico ou eletroporação:

b1- Choque térmico:

· Colocar 2 µl da ligação em um microtubo de 1,5 ml.

· Adicionar 50 µl de célula competente: células de *E. coli* (XL1-Blue (armazenada a -80 °C)

· Incubar por 20 min. no gelo

· Incubar a 42 °C, por 1 min

· Incubar por 2 min. no gelo

· Adicionar 950 µl do meio SOC (ou completar para 1 ml)

· Incubar por 1,5 h a 37 °C, sob agitação.

Meio SOC (5 ml)

5 ml de meio SOB
100 ml glicose 1M

Meio SOB (40 ml)

0,8 g bacto-triptona
0,2 g extrato de levedura
0,02 g NaCl
Ajustar o pH para 7,0
Adicionar 400 ml KCl 250 mM
Esterilizar em autoclave por 20 min.
Adicionar 200 ml MgCl₂ 2M

b2- Eletroporação:

· Colocar 2 µl da ligação e 2 ml de água em um microtubo de 1,5 ml.

· Colocar na cubeta (0,2 µl) do eletroporador 4 ml da ligação e adicionar 50 ml de células competentes (células de *E. coli* XL1-Blue armazenada a -80 °C). Deixar no gelo por 5 min e submeter ao eletroporador.

· Adicionar 950 µl do meio SOC ou LB (ou completar para 1 ml) imediatamente na cubeta e transferir para tubo de 1,5 ml.

DNA (200 ng)

2 ml

· Incubar por 1,5 h a 37 °C, sob agitação. Armazenar a 4 °C.

c- Seleção de colônias positivas, com X-Gal/IPTG (Os plasmídios que tiveram o fragmento de DNA inserido são identificados por sua capacidade de formar colônias sem cor, quando inoculados em meio contendo IPTG e X-Gal).

· Inocular 150 µl da cultura de células transformadas em placa com X-Gal/IPTG. Espalhar de forma homogênea com alça de vidro. Deixar secar e incubar a 37 °C, por 12 h. Incubar a 4 °C por 4 h, para identificação das colônias brancas (as colônias azuis, não transformadas, são descartadas).

Preparo de X-Gal e IPTG na superfície do meio de cultura LB sólido com ampicilina (12,5 mg)

| | |
|-------------------|--------|
| LB líquido | 200 µl |
| IPTG (0,5M) | 16 µl |
| X-Gal (40 µg/ ml) | 40 µl |

Espalhar de forma homogênea com alça de vidro na superfície de meio LB sólido em placa de Petri (14 cm de diâmetro) e deixar secar.

d- Calcular a eficiência da transformação: colônias brancas/total de colônias. Calcular quantos ml da célula transformada deverão ser inoculados numa placa, para que as colônias não fiquem muito próximas umas das outras.

2- Seleção de clones positivos (com SSR) com sonda complementar

a- Inocular as células transformadas em meio LB amp com X-Gal e IPTG e incubar por 12 h a 37 °C. Armazenar a 4 °C.

b- Repicar as colônias positivas (brancas) em duas placas, com meio LB amp sólido, com e sem membrana de nitrocelulose, na mesma ordem. Colocar uma folha de papel quadriculada, contendo numeração de 1 a 100, sob uma placa grande com meio LB amp e em uma segunda placa contendo o mesmo meio, depositar uma membrana de nitrocelulose sobre o meio. Utilizando palitos autoclavados, retirar cada colônia branca e inocular nas duas placas, na mesma posição. As duas placas são colocadas em estufa a 37 °C, por 12 h.

c- Preparo das membranas para hibridização:

· Desnaturar a membrana, por 5 min, em solução desnaturante: 0,5 M NaOH e 1,5 M NaCl; (o lado das colônias virado para cima)

· Neutralizar a membrana, por 5 min, em solução neutralizante: 0,5 M Tris-HCl pH 7,4 e 1,5 M NaCl. (o lado das colônias virado para cima);

· Tratar a membrana por 5 min. em solução SSC 2X (o lado das colônias virado para cima).

· Secar sobre papel Whatman 3M, na bancada, por pelo menos 30 min.

· Adicionar controle positivo (clone com SSR) à membrana

· Fixar o DNA às membranas através de luz Ultra Violeta ("crosslinker")

· Colocar a membrana em solução de lavagem (2X SSC + 0,1 SDS), por 10 min., sob agitação

· Retirar o excesso de colônias, passando o dedo com luva nova sobre a membrana imersa na solução de lavagem. Repetir umas 10 vezes, com cuidado para não rasgar a membrana.

· Trocar a solução de lavagem por uma limpa e deixar a membrana incubando por mais 10 min.

· Deixar a membrana secar sobre papel Whatman 3, sobre a bancada.

d- Pré-hibridização da membrana, por 3 h, a 65 °C (5X SSC, 0,1% N-laurylsarcosine, 0,02% SDS, 1% "blocking" reagent). (Ver item i de *Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR*).

e- Hibridização das membranas com sondas poli AG/TC marcadas com digoxigenina desnaturadas e hibridizadas às membranas, por 12 h. (Ver item i de *Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR*)

f- Lavagens das membranas (Ver item j de *Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR*)

g- Preparação das membranas para detecção quimioluminescente (Ver item k de *Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR*)

h- Exposição das membranas a filmes de raio X. (Ver item k de *Construção de biblioteca genômica enriquecida para SSR*)

i- Identificação das placas que contêm clones positivos para SSRs, após revelação em filmes de autoradiografia de raio X.

3- Identificação de clones positivos por PCR-ancorado

(Taylor *et al.*, 1992; Rafalski *et al.*, 1996) para verificação da presença, da orientação e do tamanho do inserto de SSR. Utilizado no desenvolvimento de microsatélites em grande escala, principalmente para o uso em mapeamento genético, que necessita de um grande número de marcadores.

Os clones positivos, visualizados no filme de raio X, são tocados com uma ponteira e transferidos para um microtubo de 1,5 ml, contendo 40 µl de água MiliQ esterilizada. A reação da PCR cujo volume final é de 13 µl deve conter 2 µl de DNA bacteriano, tampão 1X, dNTP 2,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Taq DNA polimerase 1U e H₂O. Cada clone deve ser testado utilizando-se os "primers" M13 (Anexo 2), na seguinte ordem:

- 1- Primers "forward" (f) + reverse" (r): amplificam o inserto inteiro;
- 2- f + AG: amplificam do "primer" "forward" até uma seqüência repetitiva TC;
- 3- r + CT: amplificam de uma seqüência repetitiva AG até o "primer" "reverse";
- 4- f + CT: amplificam do "primer" "forward" até uma seqüência repetitiva AG;
- 5- r + AG: amplificam de uma seqüência repetitiva TC até o "primer" "reverse".

Reação:

| | 1 placa |
|-------------------|--|
| H ₂ O | 1501 µl |
| Tp 10X | 270 µl |
| dNTP | 270 µl |
| MgCl ₂ | 54 µl |
| Taq | 11 µl |
| Total | 2106 µl / 5 = 421,2 µl de mix por primer |

Fazer o mix inteiro e, em seguida, dividir em cinco tubos, colocando 11 µl do par de primers a 10 µM (5 µM cada). Desta forma, a concentração final dos primers na reação será de 0,9 µM. Em cada poço colocar 2 µl de DNA e 23 ml do mix.

Para cada placa vão 16 clones:

| | 1 2 3 4 5 | | 1 2 3 4 5 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| Clone 1 | o o o o o | Clone 2 | o o o o o |
| Clone 3 | o o o o o | Clone 4 | o o o o o |
| Clone 5 | | | |

No termociclador:

| | |
|-----------|-------|
| 94°C – 5' | } 30x |
| 94°C – 1' | |
| 58°C – 1' | |
| 72°C – 1' | |
| 72°C – 7' | |

5- Isolamento do DNA plasmidial para sequenciamento por lise alcalina.

Seguir Sambrook *et al.*, 1989 vol.3 B.12.

6- Isolamento do DNA para sequenciamento por PCR dos clones positivos.

Preparo do DNA para PCR a partir da bactéria:

- Adicionar 80 µl de H₂O em um tubo de 1,5 ml
- Encostar na colônia de bactéria com uma ponteira amarela e colocar no tubo com H₂O.
- Incubar a 95°C por 5 minutos.
- Amazenar a 4°C em geladeira.

PCR para preparo de DNA para sequenciamento:

| | 1 reação (µl) | Coquetel p/106 reações (µl) |
|----------------------------|---------------|-----------------------------|
| H ₂ O | 26,85 | 2846,1 |
| Tampão 10X | 5,00 | 530,0 |
| dNTP (2,5mM) | 7,00 | 742,0 |
| MgCl ₂ (2,5mM) | 1,14 | 120,8 |
| Primer M13 F+R (10µM) | 1,75 | 185,5 |
| Taq DNA polimerase (5U/µl) | 0,26 | 27,6 |

Adicionar em cada poço de uma placa de 96 poços:

- 8 µl de H₂O + DNA bacteriano .
- 42 µl do coquetel.
- 50µl de óleo mineral.

Programa para PCR ancorado:

| | |
|------------|-------|
| 94°C – 5' | } 30x |
| 94°C – 1' | |
| 58°C – 1'' | |
| 72°C – 1' | |
| 72°C – 7' | |

- Precipitar e purificar com acetato de sódio e etanol
- Quantificar e usar 100 ng por reação de sequenciamento

7- **Seqüenciamento dos clones positivos e desenho de "primers":**

a- Amplificação dos insertos via PCR usando "primers" complementares às seqüências dos vetores (Anexo 2).

b- Purificação do produto da amplificação:

- Numerar os tubos, começando do 2 (o 1 vai ser o controle)
- Colocar 1 µl de acetato de sódio 3 M, pH 6,0
- Colocar 25 µl de etanol absoluto
- Colocar toda a reação
- Agitar, em vortex, rapidamente e deixar no gelo, por 10 min.
- Centrifugar por 30 min. a 12.000 rpm.
- Retirar o sobrenadante e lavar o "pellet" com 200 µl de etanol 70%
- Retirar o etanol com pipeta
- Secar o "pellet" por 8 min. na centrífuga à vácuo

· Colocar 3 µl de tampão de carregamento para o sequenciamento

c- Sequenciamento em seqüenciador automático de DNA Applied Biosystems 377 (Perkin Elmer/ABI), utilizando-se marcação fluorescente com "dye-terminator" (Figura 1).

d- Desenho de "primers" complementares à cada região flanqueadora das seqüências SSR. Para isso, há um programa disponível gratuitamente na Internet (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), chamado Primer 3 (Whitehead Institute of Biomedical Research). No desenho dos "primers", alguns critérios rigorosos devem ser definidos neste programa, para evitar a amplificação de produtos inespecíficos, entre estes: temperatura média de "melting" de 52 a 68 °C; diferença máxima de 3 °C na temperatura de "melting" entre cada "primer" do par; conteúdo de GC entre 40 e 60%, ausência de complementaridade entre os pares de "primers". Os demais parâmetros são os pré-definidos pelo programa.

8- **Verificação da eficiência dos "primers" desenhados e qualidade do produto amplificado por PCR:**

Uma vez sintetizados os primers, deve-se fazer uma otimização das condições de PCR, principalmente da temperatura de anelamento dos primers e da concentração do cloreto de magnésio. A PCR, com volume final de 13 µl, deverá conter: 0,3 mM de cada "primer", uma unidade de *Taq* DNA polimerase, 0,2 mM de cada dNTP, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5-2,5 mM MgCl₂, DMSO (50%) e 7,5 ng do DNA. A reação de amplificação deve seguir os seguintes passos: 94 °C por 5 min., seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min., 50-64 °C por 1 min., 72 °C por 1 min.; e 72 °C por 7 min. A primeira reação de amplificação com cada "primer" deve ter temperatura de anelamento de 56 °C. Aqueles que, além da banda correspondente ao microsatélite, apresentem amplificações inespecíficas devem ter a temperatura de anelamento aumentada a fim de melhorar a especificidade do "primer". Por outro lado, os "primers" que não produzirem amplificação ou resultarem em bandas fracas a 56 °C, devem ter esta temperatura diminuída, até a obtenção de bandas com boa resolução. Os fragmentos devem ser primeiramente visualizados em géis de agarose a 3.5% (Figura 1).

Referências Bibliográficas

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interespecific cross *Oryza glumaepatula* X *O. sativa*. *Hereditas* 134: 59-71.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; AND GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 816-827.

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.01-27, 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: 47 CONGRESSO NACIONAL DEGENÉTICA, 2001, Águas de Lindoia. Congresso Nacional de Genética, 47. Águas de Lindoia: Sociedade Brasileira de Genética, 2001. v.Anais.

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. Embrapa: , n.16, p.1 - 40, 2000.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; AND GRATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83: 748-756.

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. 2001. 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*). Tese de Doutorado, UnB

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.

LEMES, MR, BRONDANI, RPV, GRATTAPAGLIA, D. 2002. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity** 93(4): 287-290.

MORETZSOHN, M.C., COELHO, P.J.A., AMARAL, Z.P.S., HERCOS, A.P., TUPINAMBÁ, E.A. 2001. Desenvolvimento e uso de marcadores microsatélites na análise da variabilidade genética de ecótipos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa**, 16, 25 p.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; E MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning – A laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G. & TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v.88, p.1-6, 1994.

ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.** 11: 1-16

Circular Técnica , 20

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) -
Brasília, DF. CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2003): 150 unidades

Comitê de publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretário-Executivo: Maria José de Oliveira Duarte
Membros: Maurício Machaim Franco
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Luciano Lourenço Nass
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares Campos Carneiro

Expediente

Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Editoração eletrônica: Giscard Matos de Queiroz