

Otimização dos Microsatélites DIK4755, INRA192 e DIK4913 em Multiplexes

39 Circular Técnica

Bagé, RS
Dezembro, 2010

Autor

Magda Vieira Benavides
Zootecnista,
Doutora (Ph.D.) em
Wool Science,
Pesquisadora da
Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242,
CEP 96401-970, Bagé-RS,
magda@cppsul.embrapa.br

Esta publicação é uma continuidade do Documento Embrapa 90/2009 'Otimização dos microsatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 e CSKB074 em multiplexes', no qual foram conceituados termos como polimorfismo, marcadores genéticos e microsatélites e enfatizada a relevância do estudo de marcadores moleculares na busca de regiões genômicas associadas a uma determinada característica de importância econômica em animais domésticos de exploração comercial.

O processo de genotipagem de microsatélites consta das etapas de coleta de sangue, extração e quantificação de DNA, otimização das condições de PCR, PCR propriamente dita, desnaturação de fragmentos e genotipagem propriamente dita. A otimização é a fase que demanda mais atenção e tempo. É também a etapa que permite reduzir custos de genotipagem e tempo gasto no procedimento de bancada uma vez que vários marcadores podem ser inseridos em uma mesma reação.

O objetivo desta publicação é mostrar o trabalho envolvido nas análises genotípicas dos microsatélites DIK4755, INRA192 e DIK4913. Normalmente é realizada a análise de um marcador de microsatélite de cada vez (INNIS; GELFAND, 1990), mas a otimização de mais de um marcador em uma única reação (multiplex); (ELNIFRO et al., 2000) reduz tempo e custos. Estes marcadores foram escolhidos para identificar a variabilidade genética existente entre bovinos de uma mesma raça.

Descrição sucinta da técnica. Foram usados microsatélites de mesmo fluoróforo cujos fragmentos, que se distanciam pelo menos 20pb, foram otimizados em várias reações. A otimização iniciou com o teste de temperatura de anelamento, concentração de Mg, oligos, DNA e de enzima (ISHII et al., 2001). Foram usados DNA genômicos de bovinos, com concentração inicial de 10ng/μL.

Caracterização. A descrição dos microsatélites usados na amplificação está detalhada na Tabela 1. A reação de PCR constou de 10ng/μL de DNA genômico, 20μM de cada primer forward, 20μM de cada primer reverse, 300μM dNTPs, 2,5 U Taq DNA polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 1X tampão PCR e para um volume final de 5μL de reação. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 96°C por 2min, *touchdown* de quatro ciclos a 96°C-60°C-72°C por 60-30-60seg, 30 ciclos a 96°C-56°C-72°C por 60-30-60seg e extensão final de 72°C por 5min. As reações de PCR foram amplificadas em placas e para a genotipagem 1μL de produto de PCR foi transferido a placas de sequenciamento, desnaturadas a 96°C por 5min em 10μL de formamida com marcador de peso interno e genotipadas em sequenciador ABI.

Na primeira otimização foi utilizada uma temperatura de anelamento igual a 54°C. No entanto, o marcador INRA192 não mostrou boa definição de alelos (observados como picos no Diagrama 1). Uma segunda amplificação usando a temperatura de anelamento de 56°C amplificou os fragmentos com melhor qualidade de picos e foi possível definir genótipos de forma segura. Como a qualidade de amplificação dos outros dois marcadores - que já havia sido amplificada com boa qualidade de fragmentos - permaneceu inalterada, foi utilizada a segunda temperatura de anelamento para as genotipagens.

Impactos esperados. A otimização dos microsatélites DIK4755, INRA192 e DIK4913 em multiplex permite uma agilização da genotipagem, reduz custo de genotipagem e tempo de bancada para PCRs e leituras.

Referências

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 13, n. 4, p. 559-570, Oct. 2000.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Basic methodology: optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.;

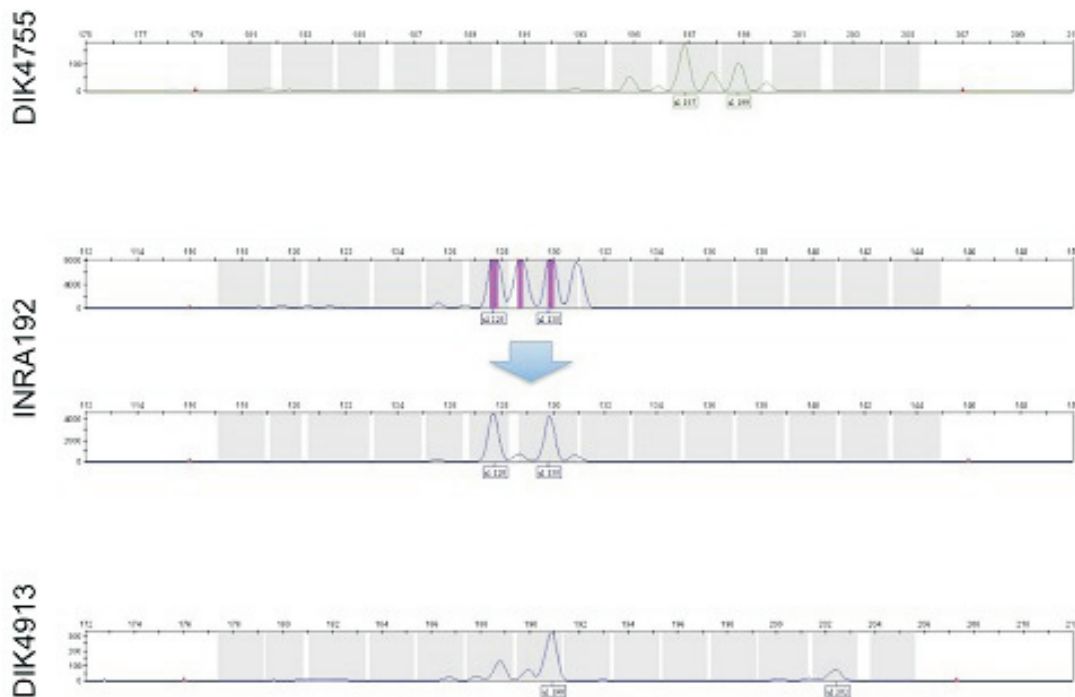
WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 1-12.

ISHII, K.; FUKUI, M. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 8, p. 3753-3755, Aug. 2001.

Tabela 1. Nome do marcador, localização no cromossomo bovino (*Bos taurus* BTA), número de alelos, variação no tamanho de alelos e seqüências *forward* e *reverse* dos microssatélites estudados.

Marcador	BTA	alelos	min	max	Seqüência <i>forward</i>	Seqüência <i>reverse</i>
DIK4755	3	8	181	205	CCCATTGCTTCCTATCTCTCC	GGTGAACAGCAAAGGGACTT
INRA192	7	9	124	144	GACCTTTACAGCCACCTCTTC	TGTTTTAATTTGCATTTCTGA
DIK4913	28	8	180	202	AATCAGCTTCCGAGGTCTG	CTCTAAAGCTGGCGAGGAAG

Diagrama 1. Eletroferogramas referentes à otimização dos marcadores DIK4755, INRA192 e DIK4913.



Circular Técnica, 39 Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Pecuária Sul
 Endereço: BR 153, km 603, Caixa Postal 242,
 96401-970 - Bagé, RS
 Fone: (53) 3240-4650
 Fax: (53) 3240-4651
 e-mail: sac@cppsul.embrapa.br



1ª edição on line

Comitê de Publicações Presidente: *Naylor Bastiane Perez*
 Secretária-Executiva: *Graciela Olivella Oliveira*
 Membros: *Daniel Portella Montardo, Eliara Freire Quincozes, Graciela Olivella Oliveira, João Batista Beltrão Marques, Magda Vieira Benavides, Naylor Bastiane Perez, Renata Wolf Suñe, Sergio Silveira Gonzaga*

Expediente Supervisão editorial: *Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul*
 Revisão de texto: *Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul*
 Tratamento das ilustrações: *Roberto Cimirro Alves*
 Edição eletrônica: *Roberto Cimirro Alves*