

# Otimização dos Microsatélites DIK4755, INRA 192 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](mailto: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 MgCl<sub>2</sub>, 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 deformamida 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.;

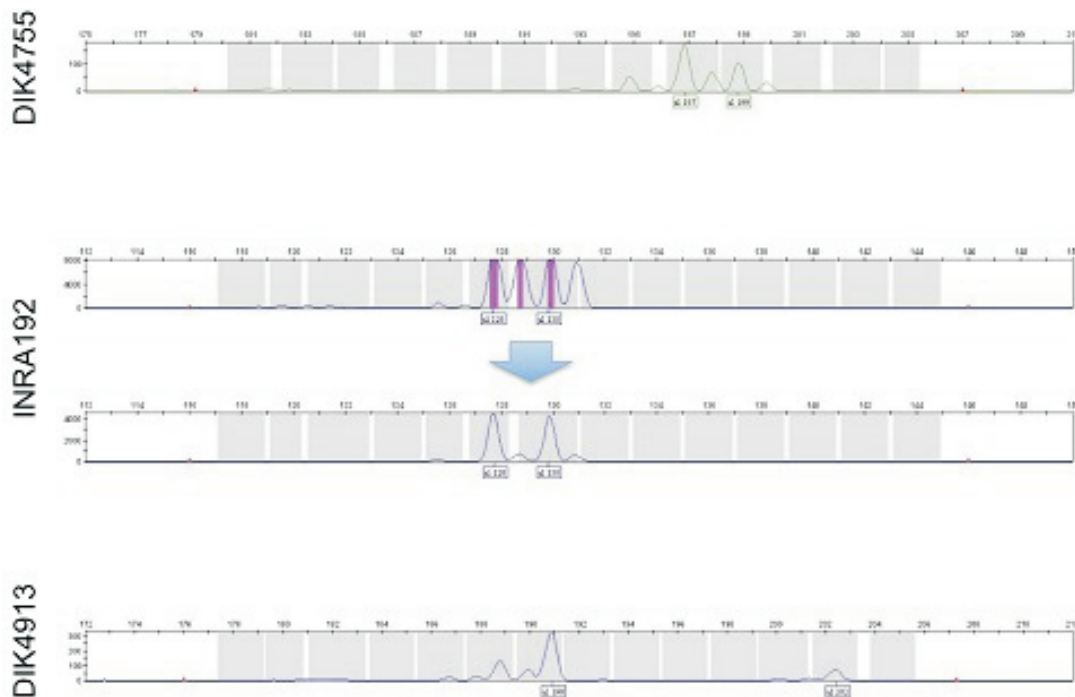
WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 1-12.

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*