

Otimização dos Microssatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 e CSKB074 em Multiplexes



ISSN 1982-5390

Dezembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilenses
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 90

Otimização dos Microssatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 e CSKB074 em Multiplexes

Magda Vieira Benavides

Embrapa Pecuária Sul
Bagé, RS
2009

Embrapa Pecuária Sul

BR 153, km 603 - Caixa Postal 242

96401-970 - Bagé, RS

Fone/Fax: (0XX53) 3240-4650

<http://www.cppsul.embrapa.br>

sac@cppsul.embrapa.br

Comitê Local de Publicações da Embrapa Pecuária Sul

Presidente: Naylor Bastiani Perez

Secretária-Executiva: Graciela Olivella Oliveira

Membros: Alexandre Costa Varella, Eliara Quincozes, João Batista Beltrão Marques,

Magda Vieira Benavides, Naylor Bastiani Perez, Renata Wolf Suñe, Sergio Silveira

Gonzaga

Supervisor editorial: Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul

Revisor de Texto: Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul

Normalização bibliográfica: Graciela Olivella Oliveira

Tratamento de ilustrações: Tamile Padilha

Editoração eletrônica: Tamile Padilha

Fotos da Capa: Magda Vieira Benavides

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).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sul

Benavides, MagdaVieira

Otimização dos microssatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 E CSKB074 em multiplexes / Magda Vieira Benavides. _ Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2009.

(Documentos / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1982-5390 ; 90)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso:

<<http://www.cppsul.embrapa.br/unidade/publicacoes:list/216>>

Título da página Web (acesso em 30 dez. 2009)

1. Microssatélites (Genética). 2. Marcadores genéticos. I. Título.
II. Série.

CDD 572.8633

© Embrapa, 2009

Autora

Magda Vieira Benavides

Zootecnista, Doutora (Ph.D.) em Wool Science

Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul

Caixa Postal 242, BR 153 Km 603

CEP 96401-970 - Bagé, RS – Brasil

e-mail: magda@cppsul.embrapa.br

Sumário

1. Introdução	6
2. Processo de otimização	9
2.1. Descrição sucinta da técnica	10
2.2. Caracterização	10
2.3. Impactos esperados	11
Referências	12

Otimização dos Microssatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 e CSKB074 em Multiplexes

Magda Vieira Benavides

1. Introdução

Variações na sequência de DNA influenciam caracteres de interesse pecuário como a taxa de crescimento, produção de carne, leite e lã, número de filhos por parto, resistência a enfermidades, entre outros. Diferentes seqüências em uma mesma região do DNA determinam a produção de variados tipos de proteínas que participam nas rotas bioquímicas e metabólicas responsáveis pelos caracteres produtivos.

Existem diversas técnicas para se estudar variações na sequência de uma mesma região do DNA (polimorfismos) como o "polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição" (conhecido como RFLP de "restriction fragment length polymorphism"), microssatélites e "polimorfismo de um nucleotídeo" (ou SNP do "single nucleotide polymorphism"). Apesar do SNP ser uma técnica mais nova e com grande potencial de encontrar genes associados a características, até o momento, o grande acúmulo de conhecimento tem sido obtido através dos microssatélites.

Microssatélites são seqüências de DNA de conhecida localização no cromossomo, que contém repetições de 1 a 5 bases ou nucleotídeos (Diagrama 1). Estas repetições são usadas para identificar diferenças (polimorfismos) entre indivíduos. Polimorfismos (poli=vários, morphos=formas) são variações na sequência de DNA causadas por

mutações naturais e que são de grande valia no estudo de regiões genômicas associadas a características de interesse agropecuário (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MARQUES, 2003; WALKER; RAPLEY, 1999).

Na área animal, os microssatélites têm sido amplamente usados para a confirmação de parentesco (VIGNAL et al., 2002), rastreamento de produtos (DALVIT et al., 2007), medicina forense (BUDOWLE et al., 2005), identificação de produtos de nicho de mercado (DALVIT et al., 2007; TORO et al., 2009), presença de patógenos em animais (DUVALLET et al., 1999; BRICKER, 2004) e na identificação de regiões genômicas associadas a características de interesse econômico para posterior uso em seleção animal (BARBUT et al., 2008; BEUZEN et al., 2000; BIDINOST et al., 2008; KHATKAR et al., 2004; RINCKER et al., 2006).

Uma das dificuldades encontradas no estudo dos genes que regulam características produtivas é que a maioria destas são poligênicas, ou seja, não são determinadas pela variação em um só gene. Neste caso, dentre todos os marcadores associados à característica, somente aqueles marcadores que expliquem a maior parte da variação fenotípica são usados para seleção. Por outro lado, há características que são determinadas pela variação em um gene (também chamado de gene principal) como é o caso do Booroola, uma mutação no gene BMPR-1B que causa alta prolificidade em ovinos (MULSANT et al., 2001; SOUZA et al., 2001; WILSON et al., 2001) e do músculo duplo, cujas mutações no gene da miostatina anulam a expressão deste gene (GEORGES; ANDERSSON, 1996) causando hipertrofia muscular.

Mesmo que ainda não se conheçam todos os genes que afetem características produtivas, já existem alguns marcadores que podem auxiliar na seleção animal, como no caso da:

- carne suína pálida, macia e exudativa (PSE), causada por uma mutação no receptor do gene da rianodina (conhecido como gene do halotano) (BARBUT et al., 2008);
- alta fecundidade, conhecido, como Booroola, uma mutação no gene do BMPR-1B no cromossomo ovino 6. Causa gradativo aumento do número de folículos a medida que aumenta de uma cópia (heterozigoto) para duas cópias (homozigoto) (WILSON et al., 2001);
- músculo duplo em bovinos devido à deleção do gene da miostatina (GEORGES; ANDERSSON, 1996);

- resistência ao scrapie, enfermidade homóloga da encefalopatia espongiforme (ou doença da vaca louca) na espécie ovina (GARCIA-CRESPO et al., 2005);
- alta fecundidade, conhecido como Inverdale, ligado a uma mutação no gene BMP15 no cromossomo ovino X, que em homozigose causa infertilidade das fêmeas (DAVIS et al., 2001, 2006);
- produção de leite, região ligada a posição final centromérica do cromossomo bovino 14 (COPPIETERS et al., 1998);
- síndrome da deficiência da adesão leucocitária dos bovinos (BLAD) que causa dificuldade na recuperação de infecções bacterianas, atraso na cicatrização e limitado crescimento corporal e está ligada a uma mutação no gene CD18 (NAGAHATA, 2004);
- malformação vertebral complexa que causa anormalidades na coluna vertebral e membros em fetos (CVM) ligada a uma mutação no gene SLC35A3 (KANAE et al., 2005);
- mieloencefalopatia degenerativa progressiva em bovinos, conhecida como doença de Weaver que tem sido associada ao microssatélite TGLA116 no cromossomo 13 bovino (GEORGES et al., 1993);
- maciez, ligado ao gene calpastatina e marmoreio da carne bovina, ligado ao gene da tiroglobulina (BURROW et al., 2001);
- paratuberculose ou doença de Johnes, uma doença crônica e infecciosa que causa progressiva perda de peso e tem sido associada com alelos dos microssatélites BolFNG-SNP12781 e SLC11A1-275-279-281 (PINEDO et al., 2009);
- condrodisplasia hereditária dos ovinos, que causa uma grave anormalidade músculo-esquelética nos cordeiros conhecida como "Spider Lamb Syndrome" e está ligada a uma região distal do cromossomo 6 ovino (entre o gene SLS e os marcadores OarJMP8, McM214, OarJMP12, and BL1038) (COCKETT et al., 1999a);
- produção de carne, conhecido como "callipyge", ligada a região distal do cromossomo ovino 18 (COCKETT et al., 1999b).

Esta relação não tem o propósito de servir como uma extensa lista de marcadores já descritos na literatura e/ou em uso em programas de seleção, mas sim de mostrar o potencial que este conhecimento tem em identificar indivíduos com características produtivas desejáveis, de forma rápida e precoce, principalmente para caracteres de resistência a doenças, medidas limitadas a um sexo (ex. produção de leite), e de carcaça.

A identificação dos genes que determinam variações nas características produtivas depende de um longo estudo que inicia com informações de parentesco e de medições de produção (fenótipos). Posteriormente estes dados são avaliados contra informações provenientes das análises laboratoriais de DNA que são os dados de genótipos.

Em termos de custo, os registros de pedigree e de produção são os itens mais dispendiosos do processo de identificação de genes, mesmo que seja coberto pela manutenção e manejo dos animais em estabelecimentos rurais privados ou em nas estações experimentais. As análises laboratoriais também possuem altos custos uma vez que são dependentes de reagentes de elevado padrão de qualidade e de uso exclusivo para biologia molecular. A redução de custos laboratoriais é recomendada e a otimização de várias análises em uma só etapa como a de PCR e de genotipagem propriamente ditas é vantajosa, reduzindo também o tempo de análise.

2. Processo de otimização

O processo de genotipagem de microssatélites consta das seguintes etapas: coleta de sangue, extração de DNA, quantificação de DNA, otimização das condições de PCR, PCR propriamente dita, desnaturação e genotipagem propriamente dita. A etapa de otimização é a mais laboriosa e a correta definição das condições de PCR é o fator mais importante na qualidade dos resultados. O tempo e o custo envolvido nos processos de PCR e genotipagem podem ser reduzidos quando são amplificados e genotipados vários microssatélites em uma só reação. Este melhor aproveitamento é possível combinando oligonucleotídeos de cores (fluoróforos) distintas que amplifiquem diferentes tamanhos de fragmentos na mesma reação.

O objetivo desta publicação é mostrar o trabalho envolvido na otimização de multiplexes e como o custo das análises genotípicas podem ser reduzidos através da otimização em multiplexes. A continuação é descrita uma otimização realizada para os microssatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 e CSKB074 em uma única reação (multiplex). Estes dados compõem um banco de dados de resistência genética a endoparasitos em bovinos.

2.1. Descrição sucinta da técnica

Foram usados os microssatélites BM4311, BMC1207, BMS1004, BMS1617, BMS6026 e CSKB074 que amplificam fragmentos com tamanhos distintos (Tabela 1). Nos marcadores que amplificam fragmentos de tamanhos similares foram utilizadas cores (fluoróforos) diferentes para evitar sobreposição e uma distância de pelo menos 20 pb entre cada marcador foi observada. A otimização iniciou com o teste de temperatura de anelamento (50, 52, 54, 56 e 58°C), seguida de testes com diferentes concentrações de Mg (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 mM MgCl₂), *primers* (10, 15 e 20 pmol), DNA (5, 10, 50, 100 ng DNA/uL) e de enzima (1U, 2,5U, 5U). Foram usados DNA genômicos de bovinos.

2.2. Caracterização

A descrição dos microssatélites usados na amplificação está detalhada na Tabela 1. Foram usados marcadores dos cromossomos bovinos 5, 6, 14, 15 e 26. Para os marcadores testados, após as otimizações, a reação final de PCR constou de 100 ng/uL de DNA genômico, 20 pmol de cada *primer forward* e *reverse*, 300 M dNTPs, 5 U Taq DNA polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 1X tampão PCR e para um volume final de 25 uL de reação. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 96° C por 2 min, *touchdown* de quatro ciclos a 96-62-72° C por 60-30-60 seg, 30 ciclos a 96-58-72° C por 60-30-60 seg e extensão final de 72° C por 5 min. As reações de PCR foram amplificadas em placas de 96 poços e para a genotipagem de 1uL de produto de PCR foi transferido a placas de sequenciamento, desnaturadas a 96° C por 5 min em 10 uL de formamida com marcador de peso interno e genotipadas em sequenciador ABI.

Os reagentes foram divididos como sendo de custo fixo (*primers* e placas/tubos) ou variável (enzimas, dNTPs, marcador de peso interno, agente desnaturante, polímeros, tampões e capilares específicos). O custo variável compôs 93,9% do custo total, o que permite uma ampla margem para a redução do preço da reação. A relação entre redução de custo e aumento do número de marcadores está no Gráfico 1 e os resultados mostram uma redução de 50% até 82% quando usados de 2 até 6 marcadores por multiplex, respectivamente. Uma limitante encontrada é que a maioria dos marcadores de microssatélite bovinos amplifica fragmentos de tamanho entre 100 - 240 pb, limitando o número de marcadores por reação, nestes casos o re-desenho de *primers* pode ser considerado, sempre e quando houver informação de sequenciamento disponível, no entanto há que se considerar o custo de uma nova síntese de *primer* marcado com fluoróforo.

2.3. Impactos esperados

A otimização de microssatélites em multiplexes permite uma agilização da genotipagem em larga escala e significativas reduções de custo e de mão-de-obra durante as etapas de PCR e de genotipagens. A otimização destes microssatélites em estudos de varredura genômica efetivamente reduz custos com amplificação e genotipagem.

Referências

BARBUT, S.; SOSNICKI, A. A.; LONERGAN, S. M.; KNAPP, T.; CIOBANU, D. C.; GATCLIFFE, L. J.; HUFF-LONERGAN, E.; WILSON, E. W. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. **Meat Science**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 46-63, May 2008.

BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG, K. C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, London, v. 160, n. 1, p. 42-52, Jul. 2000.

BIDINOST, F.; ROLDAN, D. L.; DODERO, A. M.; CANO, E. M.; TADDEO, H. R.; MUELLER, J. P.; POLI, M. A. Wool quantitative trait loci in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1-3, p. 113-118, Jan. 2008.

BRICKER, B. Molecular diagnostics of animal Brucellosis: a review of PCR-based assays and approaches. In: LÓPEZ-GOÑI, I.; MORIYÓN, I. (Ed.). **Brucella: molecular and cellular biology**. Wymondham: Horizon Bioscience, 2004. 432 p.

BUDOWLE, B.; GAROFANO, P.; HELLMAN, A.; KETCHUM, M.; KANTHASWAMY, S.; PARSON, W.; VAN HAERINGEN, W.; FAIN, S.; BROAD, T. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. **Journal International of Legal Medicine**, New York, v. 119, n. 5, p. 295-302, Sept. 2005.

BURROW, H.; MOORE, S.; JOHNSTON, B.; BARENDSE, C.; BINDON, B. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 41, n. 7, p. 893-919, 2001.

COCKETT, N. E.; JACKSON, S. P.; SNOWDER, G. D.; SHAY, T. L.; BERGHMANS, S.; BEEVER, J. E.; CARPENTER, C.; GEORGES, M. The callipyge phenomenon: evidence for unusual genetic inheritance. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, p. 221-227, 1999b. Supplement 2.

COCKETT, N. E.; SHAY, T. L.; BEEVER, J. E.; NIELSEN, D.; ALBRETSSEN, J.; GEORGES, M.; PETERSON, K.; STEPHENS, A.; VERNON, W.; TIMOFEEVSKAIA, O.; SOUTH, S.; MORK, J.; MACIULIS, A.; BUNCH, T. D. Localization of the locus causing Spider Lamb Syndrome to the distal end of ovine chromosome 6. **Mammalian Genome**, New York, v. 10, n. 1, p. 35-38, Jan. 1999a.

COPPIETERS, W.; RIQUET, J.; ARRANZ, J.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; GRISART, B.; KARIM, L.; MARCQ, F.; MOREAU, L.; NEZER, C.; SIMON, P.; VANMANSHOVEN, P.; WAGENAAR, D.; GEORGES, M. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. **Mammalian Genome**, New York, v. 9, n. 7, p. 540-544, July 1998.

DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M. Genetic traceability of livestock products: A review. **Meat Science**, Oxford, v. 77, n. 4, p. 437-449, Dec. 2007.

DAVIS, G. H.; BALAKRISHNAN, L.; ROSS, I. K.; WILSON, T.; GALLOWAY, S. M.; LUMSDEN, B. M.; HANRAHAN, J. P.; MULLEN, M.; MAO, X. Z.; WANG, G. L.; ZHAO, Z. S.; ZENG, Y. Q.; ROBINSON, J. J.; MAVROGENIS, A. P.; PAPACHRISTOFOROU, C.; PETER, C.; BAUMUNG, R.; CARDYN, P.; BOUJENANE, I.; COCKETT, N. E.; EYTHORSDDOTTIR, E.; ARRANZ, J. J.; NOTTER, D. R. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 92, n. 1-2, p. 87-96, Mar. 2006.

DAVIS, G. H.; DODDS, K. G.; WHEELER, R.; JAY, N. P. Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, n. 1, p. 216-221, Jan. 2001.

DUVALLET, G.; DE LA ROCQUE, S.; REIFENBERG, J.; SOLANO, P.; LEFRANÇOIS, T.; MICHEL, J.; BENGALY, Z.; SIDIBE, I.; CUISANCE, D.; CUNY, G. Review on the molecular tools for the understanding of the epidemiology of animal trypanosomosis in West Africa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 245-248, mar./abr. 1999.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

GARCIA-CRESPO, D.; JUSTE, R.; HURTADO, A. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. **BMC Veterinary Research**, London, v. 1, n. 3, Sept. 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-1-3.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

GEORGES, M.; ANDERSSON, L. Livestock genomics comes of age. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 907-921, Oct. 1996.

GEORGES, M.; DIETZ, A. B.; MISHRA, A.; NIELSEN, D.; SARGEANT, L. S.; SORENSEN, A.; STEELE, M. R.; ZHAO, X. Y.; LEIPOLD, H.; WOMACK, J. E.; LATHROP, M. Microsatellite mapping of the gene weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 3, p. 1058-1062, Feb. 1993.

KANAE, Y.; ENDOH, D.; NAGAHATA, H.; HAYASHI, M. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Turlock, v. 17, n. 3, p. 258-262, May 2005.

KHATKAR, M.; THOMPSON, P.; TAMMEN, I.; RAADSMA, H. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetics Selection & Evolution**, Les Ulis Cedex, v. 36, n. 2, p. 163-190, Mar./Apr. 2004.

MARQUES, E. K. **Diagnóstico genético-molecular**. Canoas: Ulbra, 2003. 371 p.

MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; SCHIBLER, L.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; PISSELET, C.; RIQUET, J.; MONNIAUX, D.; CALLEBAUT, I.; CRIBIU, E.; THIMONIER, J.; TEYSSIER, J.; BODIN, L.; COGNAC, Y.; CHITOUR, N.; ELSÉN, J.-M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 9, p. 5104-5109, Apr. 2001.

NAGAHATA, H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): A review. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 12, p. 1475-1482, Dec. 2004.

PINEDO, P. J.; BUERGELT, C. D.; DONOVAN, G. A.; MELENDEZ, P.; MOREL, L.; WU, R.; LANGAEE, T. Y.; RAE, D. O. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 91, n. 2-4, p. 189-196, Oct. 2009.

RINCKER, C. B.; PYATT, N. A.; BERGER, L. L.; FAULKNER, D. B. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 84, n. 3, p. 686-693, Mar. 2006.

SOUZA, C.; MACDOUGALL, C.; CAMPBELL, B.; MCNEILLY, A.; BAIRD, D. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 169, n. 2, p. R1-6, May 2001.

TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 174-195, Feb. 2009.

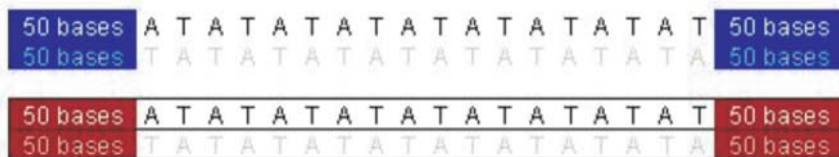
VIGNAL, A.; MILAN, D.; SAN CRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection & Evolution**, Les Ulis Cedex, v. 34, n. 3, p. 275-305, May/June 2002.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu, 1999. 334 p.

WILSON, T.; WU, X. -Y.; JUENGEL, J. L.; ROSS, I. K.; LUMSDEN, J. M.; LORD, E. A.; DODDS, K. G.; WALLING, G. A.; McEWAN, J. C.; O'CONNELL, A. R.; McNATTY, K. P.; MONTGOMERY, G. W. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein in receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, n. 4, p. 1225-1235, Apr. 2001.

Diagrama 1 - Caracterização de microsátélites com duas repetições de nucleotídeos (células somáticas ou 2N).

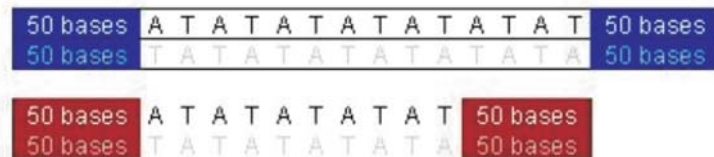
Indivíduo A que recebeu um alelo com 9 repetições AT do pai e um alelo com 9 repetições AT da mãe para o microsátélite 'XYZ'. Indivíduo homozigoto para o microsátélite 'XYZ'. Como a sequência possui um início de 50 bases + 9 repetições de 2 bases (AT) + um final de 50 bases, genótipo AT118-AT118, ambos os alelos com 118 bases.



Indivíduo B que recebeu um alelo com 7 repetições AT do pai e um alelo com 9 repetições AT da mãe para o microsátélite 'XYZ'. Indivíduo heterozigoto para o microsátélite 'XYZ'. Como a sequência possui um início de 50 bases + repetições de 2 bases (AT) + um final de 50 bases: genótipo AT114-AT118.



Indivíduo C que recebeu um alelo com 7 repetições AT do pai e um alelo com 5 repetições AT da mãe para o microsátélite 'XYZ'. Indivíduo heterozigoto para o microsátélite 'XYZ'. Como a sequência possui um início de 50 bases + repetições de 2 bases (AT) + um final de 50 bases: genótipo AT114-AT110.



A identificação dos alelos é realizada em gel de acrilamida e os alelos são separados por corrente elétrica (eletroforese).

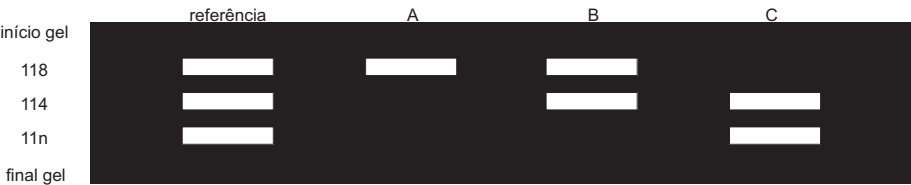


Tabela 1. Nome do marcador, localização no cromossomo bovino (*Bos taurus* BTA), número de alelos, variação no tamanho de alelos e seqüências *forward* e *reverse* dos microssatélites estudados.

Marcador	BTA	alelos	min	max	Seqüência forward	Seqüência reverse
BMS1617	5	11	143	165	GCCTGCATGTGTCTGTGG	TCTGTGTCGGAATACCCTCC
BMS6026	5	10	148	168	GCAACTAAGACCCCAACCAAC	ACTGATGTGCTCAGGTATGACG
BM4311	6	7	93	105	TCCACTTCTTCCCTCATCTCC	GAAGTATATGTGCGCTGGCC
BMC1207	14	11	128	152	ACCAACAAGTCTGAATCTTCATT	GGGTGGAATAGTCAGTCCCA
BMS1004	15	11	139	165	TTAAAGTCAGAAAGGGAAGCC	CTCGACCTCACATACTCAAAGC
CSKB074	26	3	272	276	CTGGAGCTGAATGTCAGGGACGG	AAGTCAGGAGAGTTGAAGAAAGG

Gráfico 1. Redução de preço de genotipagens em função do número de marcadores por reação.

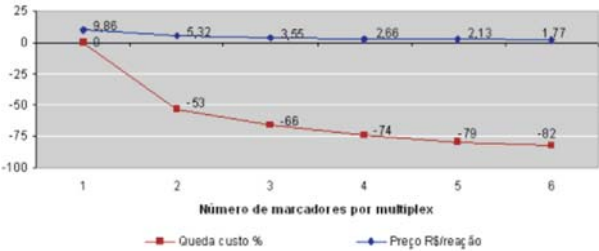
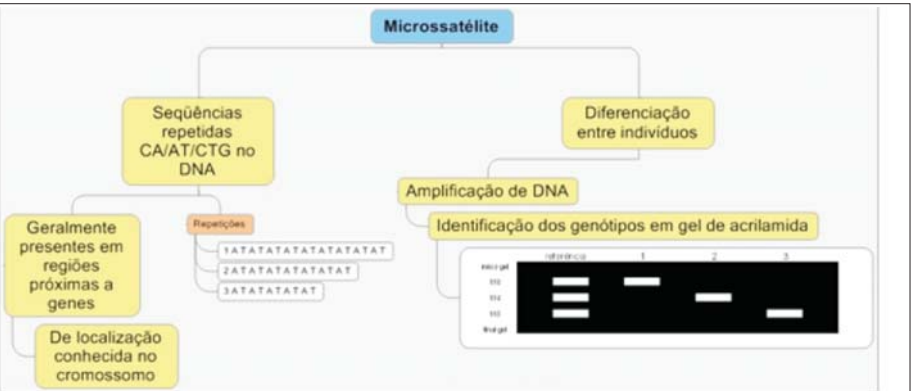


Diagrama 2. Microssatélites: conceitos e passos





Pecuária Sul

CGPE 8258

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

