

CPPSE  
AIN  
SEPARATAS

# Protocolo de Análise de Marcadores Microsatélites

PROCI-2001.00166  
REG  
2001  
SP-2001.00166

## Introdução

Em todos os genomas eucariotos é observada grande quantidade de DNA repetitivo, classificado de acordo com o número de nucleotídeos e sua complexidade. Entre esses tipos de elementos estão as seqüências microssatélites, cuja utilização representou um importante avanço na obtenção de marcadores unilocais (capítulo 2). Seu alto conteúdo polimórfico é uma característica importante para estudos de indivíduos dentro e entre populações, no estudo de parentescos e na construção de mapas genéticos de alta precisão para identificação de locos associados a doenças monogênicas e traços quantitativos.

Por estarem localizadas em regiões de cópia única, essas seqüências repetitivas do DNA podem ser analisadas pela técnica de PCR, utilizando-se *primers* complementares às seqüências flanqueadoras. A separação dos produtos de PCR deve ser realizada por um processo de alta definição, usualmente a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, pois a diferença entre alelos pode ser de apenas dois nucleotídeos.

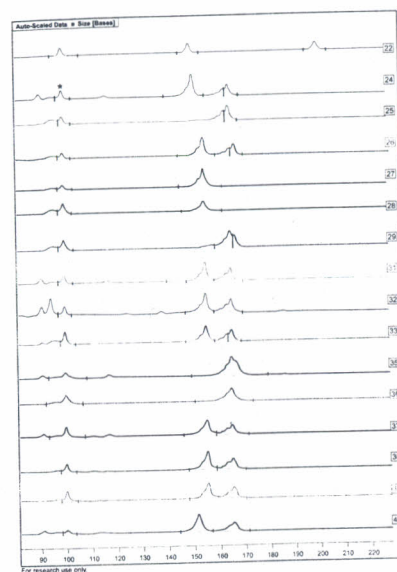
A detecção dos segmentos amplificados e separados por eletroforese pode ser realizada por coloração do gel por impregnação com prata, autorradiografia ou por detecção ótica de fluorescência induzida a laser em seqüenciador automático, como pode ser visualizado na Fig. 1. As duas últimas técnicas requerem a marcação

de um dos *primers* utilizados na PCR com isótopo radioativo ou com uma molécula fluorescente, respectivamente.

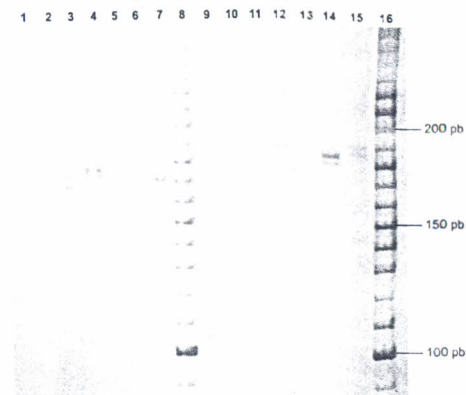
## Amplificação de seqüências microssatélites

O protocolo utilizado na amplificação de microssatélites é o mesmo utilizado para a amplificação de marcadores RFLP (capítulo 11), com as seguintes modificações:

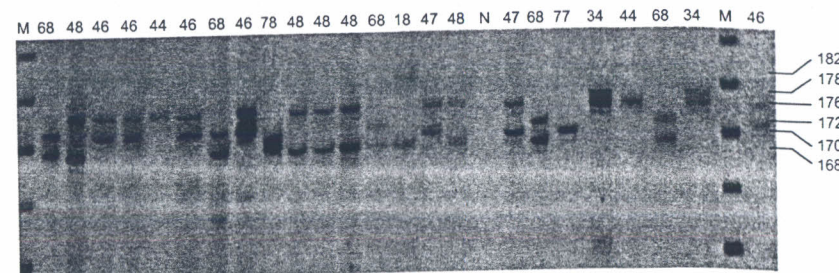
- Quando a detecção é por autorradiografia ou por fluorescência, há necessidade de marcar a extremidade 5' de um dos *primers*, normalmente o *primer* direto (*forward*), antes de utilizá-lo na reação de PCR. No primeiro caso, a marcação com isótopo radioativo é feita no próprio laboratório, utilizando a enzima polinucleotideoquinase de bacteriófago T<sub>4</sub> e, no segundo, a marcação é realizada pelo fornecedor, durante o processo de síntese desses oligonucleotídeos.
- Para as amostras a serem analisadas em seqüenciador automático, o número de ciclos de amplificação deve ser reduzido, sendo suficiente em torno de 20 a 25 ciclos. Esse procedimento é aconselhável em razão da maior sensibilidade do método, evitando-se o aparecimento de segmentos de DNA inespecíficos.
- Se a análise dos produtos de PCR será feita por impregnação



A



C



B

Fig. 1. A. Identificação dos alelos do microssatélite BM1224 (cromossomo 4 dos bovinos) em seqüenciador automático A.L.F. linha 22: padrões externos de 100, 150 e 200 pares de bases, \*padrão interno de tamanho de 100 pares de bases; B. Alelos do microssatélite CSFM50 (cromossomo 2 dos bovinos) revelados por autorradiografia de produtos de PCR utilizando marcação de um dos *primers* com <sup>32</sup>P. M = marcador de tamanho a intervalos de 10 pb, marcado por *end-labelling*; C. Coloração com prata de produtos de PCR do microssatélite CSFM50. Canaletas 1 a 5 e 7 a 12: amostras de DNA de bovino; 6: Padrão de tamanho a intervalos de 10 pb. Os tamanhos em pares de bases são indicados ao lado.

dos géis de poliacrilamida com prata, deve-se realizar no mínimo 30 ciclos de amplificação.

- Para alguns marcadores microssatélites, há a necessidade de se realizar um ciclo modificado de amplificação, denominado *touch-down PCR*. Essa estratégia consiste em iniciar a reação com temperatura de anelamento (TA) 10 graus acima da temperatura ideal para o par de *primers* utilizado. Dessa forma, trabalha-se com alta especificidade durante os primeiros ciclos de anelamento dos *primers*, reduzindo a probabilidade de acúmulo de produtos de amplificação espúrios. A temperatura é reduzida em 0,5°C a cada ciclo subsequente e, ao atingir a TA, realizam-se mais 10 a 15 ciclos.

Um exemplo de ciclo de *Touch-down PCR* é apresentado no final desta página.

## Protocolos de análise de microssatélites

Uma vez que existem vários métodos disponíveis para análise de

marcadores microssatélites, apresentamos a seguir os protocolos utilizados para cada método, separadamente.

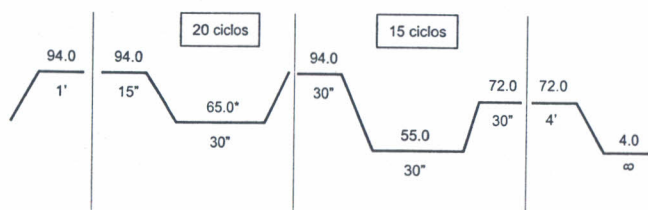
### Análise de microssatélites utilizando coloração com prata

#### a) Limpeza das placas de vidro utilizadas como molde para sustentação do gel de poliacrilamida

Essa etapa é fundamental para evitar a formação de bolhas de ar no gel. A presença de resíduos de gordura impede a penetração da solução de poliacrilamida. A seguir os procedimentos para limpeza das placas.

- Deixar as placas de vidro de molho em solução de NaOH 1N por 30 minutos.
- Lavar com detergente comum, utilizando uma esponja macia.
- Enxaguar abundantemente em água corrente, esfregando com esponja limpa.
- Deixar de molho em água destilada por pelo menos 10 minutos.
- Secar ao ar.
- Limpar com etanol absoluto, utilizando papel toalha.

*Touch-down PCR:*



\* A cada ciclo, a temperatura de anelamento é reduzida em 0,5°C, até atingir a temperatura ideal para os *primers*.

#### b) Preparação da placa maior usando *Bind-silane* ( $\gamma$ -methacryloxypropyl-trimethoxysilane).

- Separar a placa menor da maior.
- Preparar a solução de *Bind-silane* em um tubo eppendorf de 1,5 mL:

<i>Bind-Silane</i>	3 $\mu$ L
Etanol absoluto	1 mL
Ácido acético glacial	5 $\mu$ L

- Aplicar a solução de *Bind-silane* com uma pipeta sobre a placa e espalhar com papel toalha sobre toda a superfície em um sentido único. Deixar uma faixa de aproximadamente 5 cm da extremidade da placa, a região correspondente ao pente, sem aplicação de *Bind-silane*.
- Secar por 30 minutos.

- Retirar o excesso com etanol absoluto, passando papel toalha no sentido perpendicular ao da etapa anterior.

Obs: A função do *Bind-Silane* é aderir a matriz de poliacrilamida à placa de vidro, de modo a conferir resistência aos procedimentos de coloração. Deve-se tomar extremo cuidado para que essa solução não contamine a placa menor, entre os quais recomenda-se, durante o procedimento, separar as luvas usadas com *Bind-Silane* para serem usadas somente para a preparação da placa maior.

#### c) Tratamento da placa menor com *Repel-silane*

Esse tratamento tem por finalidade evitar que a matriz de poliacrilamida fique aderida à placa menor, permitindo a separação das duas placas ao final da eletroforese.

- Aplicar 1 mL de *Repel-silane* (solução de dimethyldichlorosilane a 2% em octamethyl cyclooctasilane) e espalhar com papel toalha ao longo de toda a superfície da placa.

- Secar por 10 minutos.
- Retirar o excesso com papel toalha umedecido em etanol absoluto.
- Passar *Repel-silane* no pente. Não há necessidade de retirar o excesso com etanol. Isso evita que a poliacrilamida fique retida entre os dentes do pente e seja arrancada no momento da remoção do mesmo.

#### d) Preparação do gel de poliacrilamida desnaturante para microssatélites

- Montar o molde com as duas placas e os espaçadores, vedando as laterais e a extremidade inferior com fita adesiva.
- Preparar o gel misturando, para cada gel a 6,67%, com as dimensões 30 x 40 x 0,04 cm:

Tampão do gel	53,78 mL
Acrilamida-Bisacrilamida 40% (29:1)	10,84 mL
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina)	37,52 $\mu$ L
Persulfato de Amônia 10%	375,2 $\mu$ L

- Imediatamente após a adição do persulfato de amônia, verter o gel dentro do molde de vidro. O procedimento pode ser facilitado se o molde for mantido inclinado em ângulo de aproximadamente 30° em relação à bancada. A solução deve ser vertida cuidadosamente, para não formar bolhas e, rapidamente, para evitar que a polimerização se inicie antes da conclusão dessa operação. O tempo de polimerização é dependente da temperatura, logo a manutenção das soluções estoque a 4°C aumenta a margem de segurança nessa etapa.

- Colocar o pente, cobrir a extremidade com filme plástico e prender o pente com grampos de metal.

### e) Eletroforese

- Retirar os grampos e a fita adesiva do molde de vidro.

- Retirar o excesso de poliacrilamida da região do pente e removê-lo cuidadosamente.

- Lavar as placas com água destilada e enxugar com papel toalha.

- Colocar o gel na cuba de seqüenciamento manual e virar as presilhas sem apertá-las. Apertá-las da esquerda para a direita, de cima para baixo.

- Colocar tampão de corrida na cuba superior (ânodo), certificandose de que não vaze, e depois na inferior.

- Limpar as canaletas com seringa. Alternativamente, pode-se adaptar uma tira de aproximadamente de 2 a 3 mm de largura, feita com o mesmo material utilizado para fazer o pente. Essa tira pode ser cuidadosamente introduzida nas canaletas, removendo os excessos de matriz ou de uréia.

- Fazer uma pré-corrída aplicando potência de 35 a 40 W, limitando a corrente em 40 mA, por uma hora.

- Preparar as amostras adicionando 16 µL de tampão da amostra em 25 µL de PCR (no próprio tubo da reação). Desnaturar as amostras a 92°C por 10 minutos e colocar imediatamente em banho de gelo.

- Aplicar 15 µL de amostra tratada por canaleta do gel.

**Obs.:** Os sistemas de seqüenciamento manual são acompanhados de pentes do tipo *shark teeth* que permitem a aplicação de um volume máximo de 6 µL de amostra. Para a aplicação de um volume maior, utilizam-se pentes de teflon ou vinil, feitos artesanalmente.

- Aplicar o padrão de peso molecular em uma ou mais canaletas do gel (normalmente são utilizados dois pontos de aplicação de padrão por gel). Um bom padrão para microssatélites é a "escada" de fragmentos a intervalos de

10 pb (10 bp DNA Ladder, Gibco BRL). Para esse padrão, utiliza-se 4 µL de uma diluição a 100 ng/µL, por canaleta. As alíquotas de padrão devem ser acrescidas de tampão da amostra e desnaturadas como descrito para as amostras.

- Aplicar as amostras no gel e correr nas mesmas condições descritas para a pré-corrída. O tempo de eletroforese pode ser calculado utilizando-se como referência a migração dos indicadores azul de bromofenol e xileno cianol, de acordo com a Tabela 1.

### f) Coloração por impregnação com prata

O método descrito a seguir foi adaptado do protocolo desenvolvido por Comincini et al. (1995), tendo sido alterado pela introdução do tratamento de uma placa molde com *repel-silane* e pela adaptação do volume das soluções às necessidades do volume de gel utilizado.

- Terminada a corrida, abrir o molde de vidro, colocando a placa maior em um recipiente de plástico, com o gel voltado para cima.

- Pré-tratamento: Cobrir a placa com 1,5 L de solução de etanol 10% e ácido acético 10% em água deionizada. Incubar por 20 minutos. Guardar a solução para usá-la na interrupção da coloração.

- Lavar três vezes, por 30 segundos, em água deionizada.

- Oxidação: Incubar durante 3 minutos em 1,5 L de ácido nítrico a 1%.

- Lavar três vezes, por 30 segundos, em água deionizada.

- Impregnação: 30 minutos em 1,5 L de solução contendo 1,5 g de nitrato de prata e 2,0 mL de formaldeído 37%.

- Lavagem: 30 segundos em água deionizada.

- Revelação: Incubar de 3 a 5 minutos em 1,5 L de solução contendo 11,13 g de carbonato de sódio anidro, 2,0 mL de formaldeído 37% e 7,5 mL de tiosulfato de sódio pentahidratado 200 mg/L.

- Interrompe-se a reação de coloração incubando por 5 minutos em 1,5 L da solução de pré-tratamento.

**Tabela 1.** Taxa de co-migração de moléculas de DNA fita-simples em gel de poliacrilamida desnaturante, em relação aos indicadores azul de bromofenol e xileno cianol, de acordo com o tamanho em bases.

% Poliacrilmida	Azul de Bromofenol	Xileno Cianol
5	36 b	130 b
6	26 b	106 b
8	19 b	76 b
10	12 b	55 b
20	8 b	28 b

Fonte: Adaptado de Sambrook et al., 1989.

### Observações importantes:

As soluções devem ser preparadas um pouco antes do início da coloração.

O formaldeído e a solução de tiosulfato de sódio devem ser adicionados às respectivas soluções apenas no momento do uso.

☠ O formaldeído é um reagente tóxico por inalação ou por contato com a pele. Recomenda-se a observação dos procedimentos de proteção adequados.

O volume mínimo de solução a ser utilizado em cada etapa, inclusive nas lavagens, é de cinco vezes o volume do gel, desde que esse seja suficiente para cobrir totalmente a superfície do gel.

Alguns fatores críticos para a obtenção de um bom padrão de coloração são a qualidade dos reagentes e da água utilizados. Essa última deve ser pelo menos deionizada (condutividade < 1  $\mu$ Ohm). A limpeza das placas é também importante, uma vez que impressões digitais e outros resíduos de gordura também serão impregnados pela prata.

### g) Estimativa do tamanho dos alelos

O tamanho dos segmentos amplificados pode ser estimado comparando-se suas taxas de migração com a taxa de migração do padrão de tamanho utilizado, pelo seguinte procedimento:

- Medir a distância entre a base da canaleta e a base das ban-

das correspondentes aos fragmentos de tamanho conhecido (utilizar sempre os mesmos padrões na medição).

- Construir uma curva semilogarítmica e obter a equação que descreve o comportamento migratório dos fragmentos no gel, sob as condições eletroforéticas a que foram submetidos. Estimar o valor do coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ) para verificar o ajuste dos dados. Para marcadores microssatélites, trabalhamos com valores de  $R^2 \geq 0,98$ .
- Medir, com o mesmo critério utilizado para os fragmentos do padrão de tamanho, os fragmentos resultantes da amplificação da seqüência microssatélite.
- Substituir os valores das distâncias migradas por cada produto de amplificação na equação obtida para o padrão. A solução da equação estima o tamanho dos fragmentos amplificados.
- Para facilitar o processamento dos dados, os alelos são designados com números de acordo com o tamanho. O maior alelo observado recebe a designação 1 e o alelo imediatamente menor (2 pb menor para dinucleotídeos, por exemplo) recebe o número 2. Os intervalos de 2 pb devem ser respeitados de forma que, se o próximo alelo observado for 6 pb menor do que o alelo 1, receberá a designação 4. Caso surjam

alelos com tamanho maior do que o alelo 1, esses passam a receber numeração negativa. Por exemplo, o alelo 2 pb maior que o alelo 1 recebe a denominação -1.

### Protocolo de detecção de fragmentos por seqüenciador automático

Existem diversos equipamentos desenvolvidos para análise automatizada de seqüências de DNA. Esses equipamentos diferem quanto ao uso de placas ou de colunas capilares para a separação das moléculas, além do sistema empregado para detecção dessas moléculas. O protocolo a seguir corresponde ao utilizado para o seqüenciador automático A.L.F. (Pharmacia Biotech).

#### a) Limpeza das placas

- Lavar as placas com sabão neutro e escova macia, fazendo movimentos circulares.
- Enxaguar abundantemente em água corrente e posteriormente em água destilada.
- Secar.
- Limpar alternadamente com água destilada e etanol absoluto, utilizando papel toalha.
- Secar.

#### b) Preparação da placa menor usando Bind-silane ( $\gamma$ -methacryloxy-propyl-trimethoxysilane)

O *Bind-silane* é utilizado na região superior da placa de vidro para aderir a matriz de poliacrilamida, evi-

tando danos nas canaletas do gel no momento da retirada do pente. Entretanto não há necessidade de tratar toda a extensão da placa como no protocolo de coloração com prata (ver subtítulo Análise de microssatélite utilizando coloração com prata) descrito anteriormente neste capítulo.

- Preparar a solução de *Bind-silane*:

<i>Bind-silane</i>	3,8 $\mu$ L
Etanol absoluto	1,0 mL
Ácido acético 10%	250,0 $\mu$ L

- Aplicar a solução na região do pente, espalhando sobre a superfície da placa com papel toalha.
- Secar com papel toalha.

#### c) Montagem das placas

- Posicionar os espaçadores e a lâmina de detecção de laser (certificando-se da limpeza dos mesmos).
- Fechar o sanduíche utilizando os grampos na posição indicada.
- Deixar o pente pronto para o uso.

#### d) Preparação do gel de poliacrilamida desnaturante a 5%:

- Misturar:

Solução poliacrilamida-uréia	60 mL
Persulfato de amônia a 10%	300 $\mu$ L
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina)	60 $\mu$ L
- Passar a solução preparada para o frasco de aplicação do gel e

misturar os reagentes sem que se formem bolhas.

- Aplicar o gel a partir da região inferior das placas.
- Retirar as bolhas que possam ter se formado.
- Colocar o pente observando se está corretamente alinhado com a marcação da placa menor.
- Prender o pente às placas utilizando dois grampos de metal.
- Esperar 90 minutos para utilizar o gel para corrida das amostras.

#### e) Preparo das amostras e eletroforese

Os reagentes utilizados na preparação das amostras são específicos do seqüenciador automático A.L.F. (Pharmacia Biotech). Normalmente utiliza-se um padrão externo, com vários fragmentos de tamanho conhecido, que será utilizado pelo software para estimar a função entre o tamanho dos fragmentos e a mobilidade eletroforética.

- Preparo do padrão externo 50 a 500 pares de bases:

Padrão externo	
50-500 pb	2,0 µL
Tampão de carregamento ( <i>loading dye</i> )	3,2 µL
Água ultra pura	4,0 µL

- Preparo das amostras e do padrão interno:

Juntamente com cada amostra de DNA, é acrescentado um padrão interno, de tamanho adequado para o

microsatélite que está sendo analisado. Por exemplo, para um microsatélite, cujos alelos possuam tamanhos entre 160 e 200 pb, podem ser utilizados padrões como os de 100, 150 ou 250 pb, mas não o de 200 pb.

- Preparar um coquetel contendo, para cada amostra a ser aplicada no gel:

Padrão interno	0,1 µL
Água	1,0 µL
Tampão de carregamento ( <i>loading dye</i> )	3,0 µL

- Acrescentar 4 µL de coquetel da amostra a 2 µL de amostra amplificada para o loco microsatélite.

- Desnaturar as amostras e o padrão externo a 95°C durante 5 minutos e colocá-las em gelo imediatamente após sua desnaturação.

- Montar o sistema de eletroforese e realizar uma pré-corrida aplicando uma potência de 50 W por 1 hora.

- Aplicar as amostras no gel e submetê-las à eletroforese, que deve ser realizada a uma potência de 50 W por aproximadamente 4 horas.

- Analisar os dados fornecidos pelo software Pharmacia DNA Fragment Manager V1.2 (os resultados da eletroforese são registrados sob a forma de gráficos e tabelas, referentes aos tamanhos dos fragmentos amplificados), para a identificação dos genótipos.

- Numerar os alelos com o mesmo critério descrito anteriormente no protocolo de coloração com prata.

### Considerações finais

Apesar das diferenças entre as técnicas de coloração com prata e seqüenciador automático, ambas são eficientes na identificação dos genótipos de microsatélite. O método de análise em seqüenciador automático caracteriza-se principalmente pela eficiência e rapidez na identificação de genótipos. No entanto, a mesma sensibilidade é alcançada com a utilização da coloração com prata, com um menor custo.

#### Soluções

##### Tampão TBE modificado

	Estoque [20X concentrado]	Trabalho [1,2 X]
Tris base	2 M	120 mM
Ácido bórico	195 mM	12 mM
EDTA dissódico	15 mM	1 mM

##### Solução de Uréia (10,19 M)

Uréia	612 g
-------	-------

Completar o volume para 1 litro  
Aquecer para dissolver.  
Não deixar ultrapassar de 60°C

##### Tampão do gel

Tampão TBE modificado 20X concentrado	60 mL	12 mL
--	-------	-------

Solução de uréia	1L	200 mL
------------------	----	--------

Tampão de corrida  
(Tampão TBE modificado 1,2 X)

Tampão TBE modificado 20X concentrado	60 mL
--	-------

Completar o volume para 1 litro com água destilada.

Persulfato de Amônia a 10%

0,1 g de persulfato de amônia

Completar o volume para 1 mL com água ultra pura.

Esta solução pode ser estocada em freezer por até 2 meses ou ser feita semanalmente e armazenada a 4°C.

Solução estoque de acrilamida:  
bisacrilamida, 29:1 (40%)


Acrilamida	38,67 g
N'N' metileno bisacrilamida	1,33 g

Completar o volume para 100 mL.  
Se necessário aquecer até 55°C para dissolver.  
Armazenar em frasco escuro a 4°C.

Solução estoque de acrilamida:  
bisacrilamida, 19:1 (40%)

38 g acrilamida + 2 g de bis-acrilamida

Completar o volume para 100 mL.  
Proceder como descrito no item anterior.

 A acrilamida é neurotóxica e possui efeito cumulativo! Cuidado ao manipular esses reagentes; observe os cuidados de proteção adequados.

Solução de poli-acrilamida – uréia

- Pesar 250 g de uréia.
- Adicionar 200 mL de água ultra pura e agitar em placa aquecida (ou banho-maria).

- Adicionar 62,5 mL de solução de poliacrilamida a 40% (19:1). A solução de uréia não deve ser aquecida acima de 60°C e deve ser resfriada antes da adição da poliacrilamida.
- Adicionar 50 mL de TBE 10 vezes concentrado, filtrado em filtro com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Tampão da amostra

Formamida	95 mL	14,4 mL
EDTA 0,5M pH 7.5 a 8.0	4 mL	0,6 mL
Azul de bromofenol	0,05 g	0,0075 g
Xileno Cianol	0,05 g	0,0075 g

## Referências bibliográficas

COMINCINI, S.; LEONE, P.; REDAELLI, L.; De GIULI, L.; ZHANG, Y.; FERRETTI, L. Characterization of bovine microsatellites by silver staining. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.112, p.415-420, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.