

Guia de informações e considerações no protocolo de microssatélites no NGACB

Esse guia foi criado para reunir informações relacionadas ao fluxo de trabalho com microssatélites no NGACB. Fiquem à vontade para enviar contribuições para Juliana F. Justino (juliana.justino@ufes.br).

Estrutura desse guia

1. *Primers*
2. *PCR*
3. *Escolha do primer M13 marcado*
4. *Cuidados gerais no preparo da PCR*
5. *Exemplo de mix de PCR de microssatélites*
6. *Armazenamento do produto de PCR*
7. *Gel de agarose*
8. *Genotipagem*
9. *Exemplo de mix de genotipagem de microssatélites*
10. *Resultado*
11. *Referências/Material de apoio*

1) Primers

O NGACB adota o protocolo econômico proposto por Schuelke, 2000.

Para seguir esse protocolo, são necessários 03 primers com as especificações abaixo:

I. Primer de ida específico (Forward):

Sequência original publicada + Sequência universal M13 (-21) incorporada à extremidade 5' (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) (18pb)

II. Primer Reverso – sem modificações, sequência original publicada.

III. Primer universal M13 (-21) TGT AAA ACG ACG GCC AGT (18pb) marcado com uma das 4 fluorescências compatíveis com o sequenciador ABI 3500 (PET®, NED®, VIC®, 6-FAM®)

(PET) TGT AAA ACG ACG GCC AGT

(NED) TGT AAA ACG ACG GCC AGT

(VIC) TGT AAA ACG ACG GCC AGT

(6-FAM) TGT AAA ACG ACG GCC AGT

Os primers sem a fluorescência podem ser encomendados em qualquer empresa que comercializa primers (Life Technologies, IDT, Exxtend), os primers fluorescentes tem comercialização exclusiva pela Applied Biosystems (custom.br@thermofisher.com).

OBS:

Verificar se na publicação do primer, o autor já utiliza algum tipo de cauda. É possível que a cauda esteja no primer F ou R. Somente a sequência específica (complementar à sequência alvo) deve ser utilizada para adequar ao protocolo utilizado no NGACB.

Há a possibilidade de encomendar o primer "original" com a fluorescência incorporada em um dos primers, não sendo necessário utilizar a cauda M13 e

assim, também há possibilidade de realizar PCR multiplex. Porém o custo é mais elevado.

2) PCR

Segundo o protocolo de Schuelke (2000), as adaptações necessárias são:

A) A quantidade de primer F deve ser inferior à metade da quantidade de primer R.

B) A quantidade de primer R deve ser equivalente à quantidade do primer M13 marcado.

No artigo supracitado, foram utilizados 8pmol de primer R, 8pmol do primer M13 marcado e 2pmol do primer F em uma reação de volume total de 50µL.

Convertendo para adaptar ao NGACB:

8pmol de primer/50µL de volume total de reação = 0,16pmol/µL (=0,16µM)

Utilizando $C1 \times V1 = C2 \times V2$

$C1 = 10\mu\text{M}$ (Concentração de uso do primer)

$V1 =$ Volume de primer que será adicionado ao mix de PCR

$C2 = 0,16\mu\text{M}$ (Concentração final de primer na reação de PCR)

$V2 =$ Volume final da reação de PCR (12,5µL ou 25µL geralmente)

$C1 \times V1 = C2 \times V2$

$10\mu\text{M} \times V1 = 0,16\mu\text{M} \times 25\mu\text{L}$

$V1 = 0,4\mu\text{L}$

Utiliza-se 0,4µL de primer Reverso e M13 marcado em uma reação de 25µL.

Ou, utiliza-se 0,2µL em uma reação de 12,5µL.

Para o primer F, foram utilizados 2pmol, ou seja, 4x menos (0,04 pmol/µL ou µM).

Assim, utiliza-se 0,1µL de primer Forward em uma reação de 25µL.

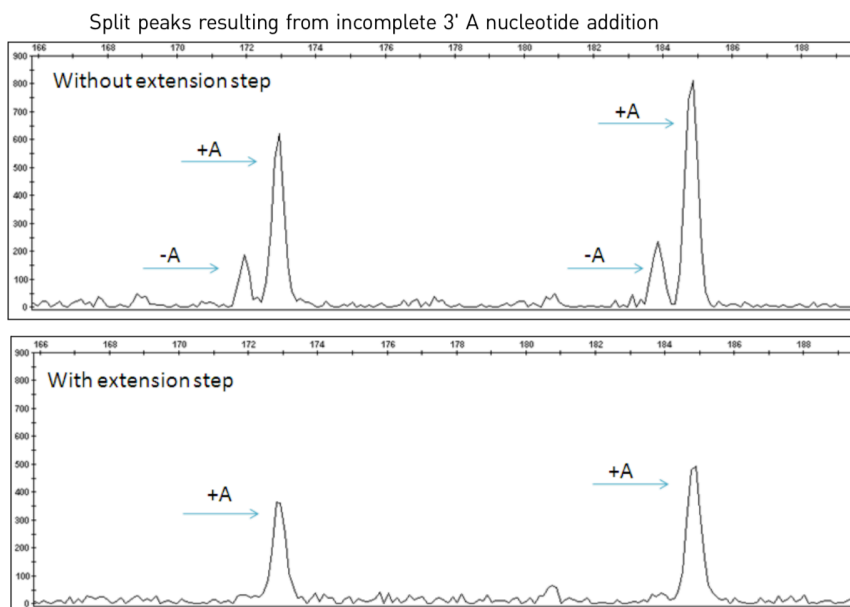
Ou, utiliza-se 0,05µL em uma reação de 12,5µL.

Adaptações aos volumes podem ser realizadas a fim de minimizar erros de pipetagem.

C) Os primeiros ciclos da PCR devem favorecer a incorporação do primer específico, posteriormente, a temperatura de anelamento deve ser reduzida para favorecer a incorporação da cauda M13 com a fluorescência. No artigo, são realizados 30 ciclos com a temperatura de anelamento do primer e 8 ciclos finais com a temperatura da cauda (53°C).

Caso a temperatura de anelamento seja menor do que a temperatura de incorporação da cauda (53°C), não é necessário fazer essa adaptação dos ciclos finais.

D) Recomenda-se que a extensão final do perfil de ciclagem da PCR seja ajustada para favorecer a adenilação. Em geral, 30 minutos são suficientes.



E) Devido à utilização da cauda, reduz-se a possibilidade de realização de PCR multiplex.

3) Escolha do primer M13 marcado

Há 4 opções de primers marcados com fluorescência. (PET) M13 (Vermelho) (NED) M13 (Amarelo/Preto) / (VIC) M13 (Verde) / (6-FAM) M13 (Azul).

A cada primer deve-se associar uma fluorescência (cor), agrupando 4 primers com 4 cores diferentes. As cores serão repetidas para um novo grupo de 04 primers. Cada grupo de 4 primers serão genotipados juntos.

O software "*Multiplex Manager*" auxilia na combinação de primers para corridas multiplex. <http://www.multiplexmanager.com>

4) Cuidados gerais no preparo da PCR

Materiais com fluorescência são fotossensíveis. No preparo do mix, retirar o M13 marcado apenas na hora de iniciar a pipetagem dos reagentes na capela (não retirar 15 minutos antes junto com os outros reagentes).

Utilizar luvas sem talco. O pó da luva pode entupir o capilar do sequenciador.

5) Exemplo de mix de PCR de microssatélites

Reagente	Concentração	Uso	Volume	Concentração Final
ddH ₂ O	-		8,95µL (q.s.p.* 11,5µL)	-
Tampão	10X		1,25µL	1X
Mg**	50mM		0,5µL	2,0mM
DNTP	10mM		0,25µL	0,2mM
Primer F	10µM		0,2µL	0,16µM
Primer R	10µM		0,2µL	0,16µM
Primer (M13) marcado	10µM		0,05µL	0,04µM
Taq Platinum	5U/µL		0,1µL	0,5U
Volume mix			11,5µL	
DNA			1,0µL	
Volume total PCR			12,5µL	

*q.s.p - quantidade suficiente para/Considerado o volume total do mix sem o DNA/se alterar o volume de qualquer reagente, ajustar o volume de ddH₂O.

** Mg pode precisar de padronização.

6) Armazenamento do produto de PCR

As amostras devem ser protegidas da luz. Utilizar racks cobertas com papel alumínio.

Deixar na geladeira apenas até a corrida em gel (e não demorar para preparar o gel).

Armazenar o material no freezer (-20°C), se possível em freezer não *frost-free* a fim de minimizar ciclos de congelamento/descongelamento e evaporação do produto.

Após 06 meses não é recomendável utilizar esse material para genotipagem. A partir de 03 meses, caso ainda não tenha sido genotipado, realizar um teste antes de correr todo o material para verificar a viabilidade das amostras.

7) Gel de agarose

Utilizar marcador de peso molecular (ladder) de 50pb ou 100pb.

Caso o gel de agarose a 1% não dê resultado satisfatório, recomenda-se testar o gel de agarose a 1,5% para visualização de reação de PCR de microssatélites.

Realizar a etapa de checagem em gel de agarose é necessária na etapa de padronização. Dependendo do material, da padronização e da quantidade de genotipagens, a checagem em gel de agarose pode ser suspensa.

8) Genotipagem

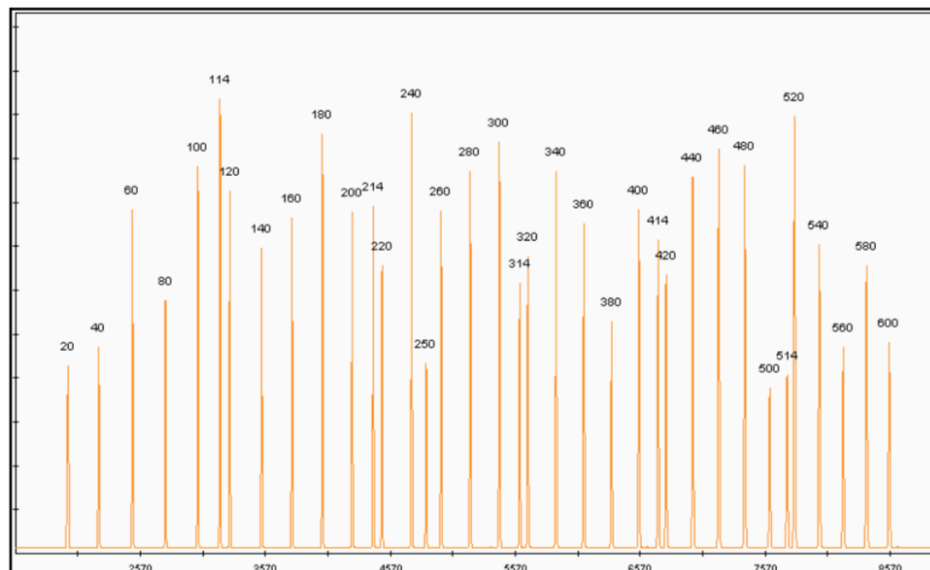
A genotipagem resulta de uma eletroforese capilar realizada em analisador genético (sequenciador) em que há a separação dos fragmentos conforme seu tamanho, com posterior análise e identificação dos alelos encontrados.

No NGACB trata-se do analisador genético modelo 3500 da Applied Biosystems.

Para corrida do material no analisador genético, prepara-se um mix com o padrão de tamanho GeneScan 600 LIZ Size Standard (LIZ) e formamida.

O LIZ possui a fluorescência de cor laranja e possui padrões de tamanho conhecido. Seu padrão é utilizado para inferir o tamanho dos picos da amostras.

GeneScan™ 600 LIZ® denatured fragment lengths (nt): 36 fragments					
20	120	220	314	414	514
40	140	240	320	420	520
60	160	250	340	440	540
80	180	260	360	460	560
100	200	280	380	480	580
114	214	300	400	500	600



A formamida é um agente desnaturante. É tóxico, carcinogênico e teratogênico. Deve-se utilizar rack e descarte específicos (ficam na bancada da sala do sequenciador). Sempre utilizar luvas. Não reutilizar as luvas após contato com a formamida (as luvas podem ser descartadas no lixo comum).

Em geral, a corrida em cada poço da placa conta com o produto gerado de 4 diferentes marcadores/cores na corrida no sequenciador. Há possibilidade de mais marcadores (cores repetidas) se juntarem na mesma corrida, porém não deve haver possibilidade de sobreposição no tamanho dos diferentes alelos.

Após a distribuição do mix (formamida + LIZ) na placa e adição das amostras, dar *spin down* na placa e levar no termociclador a 95°C por 3 minutos. Dar choque térmico. Retirar imediatamente do termociclador ao final dos 3 minutos e colocar no gelo (ou freezer) por 1-2 minutos. O material é estável por 24h. A corrida deve ocorrer logo em seguida.

9) Exemplo de mix de genotipagem de microssatélites

Reagente	Volume
LIZ Standard	0,5µL
Formamida	7,5µL (q.s.p. 10µL)*
Volume mix	8,0µL
DNA 1 (PET)	0,5 µL
DNA 2 (NED)	0,5 µL
DNA 3 (VIC)	0,5 µL
DNA 4 (6-FAM)	0,5 µL
Volume total	10,0µL

* Caso a quantidade de DNA seja alterada, o volume de formamida deve ser ajustado para que o volume total sempre seja 10µL (incluindo o DNA).

10) Resultado

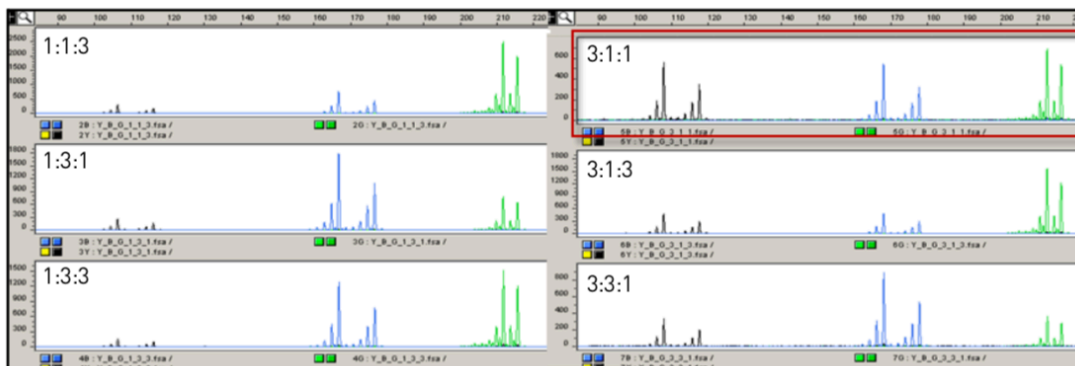
O resultado será enviado por e-mail.

Recomenda-se que a intensidade dos picos resultantes da genotipagem sejam similares e que não extrapolem o limite do equipamento, não "estoure" (medida em RFU).

Instrument	Recommended signal level	Fluorescence saturation
3500 Series	175–10,000 RFU	30,000 RFU

Pode ser necessário diluir o produto de PCR para adequar a intensidade de leitura dos picos.

Exemplo de diferentes diluições e resultados



Há diversos problemas que podem ocorrer ao analisar o resultado. Consulte o material de apoio disponível para auxiliar na melhor resolução. Principalmente Capítulo 11 (Troubleshooting) em DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis, enviado junto com esse material ou em <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/fragment-analysis-chemistry-guide.pdf>
https://blog.ufes.br/ngacb/?page_id=169

O NGACB possui em computadores da bioinformática, licença de dois softwares de análise de microssatélites: GeneMapper 4.1 e Geneious R9.

10) Considerações gerais

Ao considerar o tamanho dos alelos, levar em consideração: 1pb da adenina adicionada pela Taq (adenilação) e 18pb extras da cauda M13 (Schuelke, 2000)

É recomendável realizar a taxa de erro das genotipagens (repetição da genotipagem conforme critérios pré-estabelecidos). Verifique literatura específica e orientador (Guichoux et al., 2011).

11) Referências/Material de apoio

1. Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 2000
2. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems by Life Technologies. 2014.
3. Guichoux, et al. Current Trends in microssatelite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 2011.
4. Selkoe, K. and Toonen, R. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microssatelite markers. *Ecology Letters*, 2006.