

LABORATÓRIO DE BIODIVERSIDADE MOLECULAR E CITOGENÉTICA

O uso deste material é autorizado desde que sejam atribuídos os direitos autorais. Freitas PD, 2005. Marcadores Microssatélites em Camarões: Curso Teórico. In: [http:// www.shrimp.ufscar.br](http://www.shrimp.ufscar.br). 40 pp

Grupo de Genética de Camarões

Departamento de Genética e Evolução

Universidade Federal de São Carlos

DGE - UFSCar

Patrícia Domingues de Freitas

e-mail: patdf@iris.ufscar.br

MARCADORES DE MICROSSATÉLITES

O que são ?

Para que servem?

Quais metodologias para sua identificação?

O que são ?

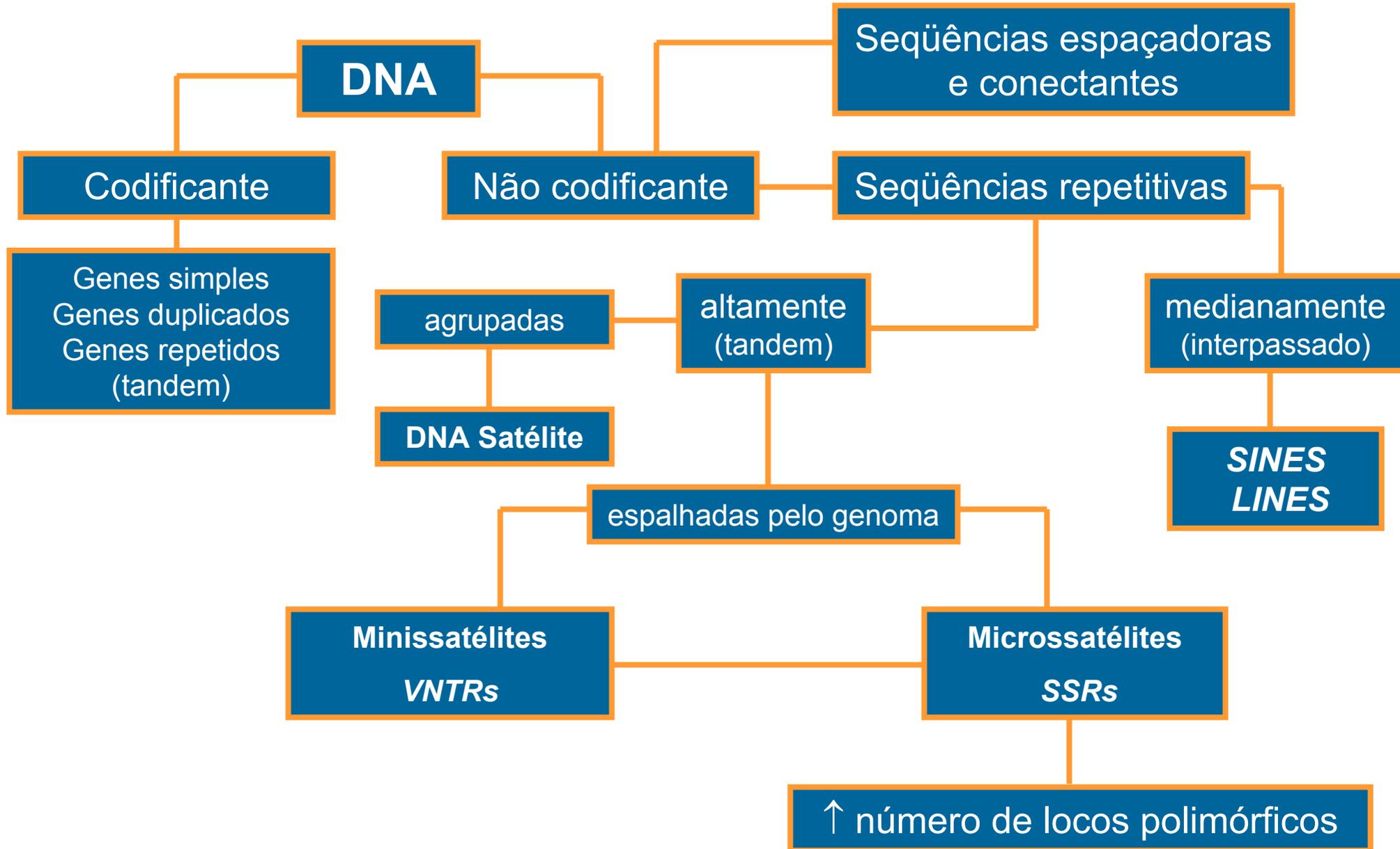
São seqüências curtas (1 a 6 pb), repetidas em *tandem*, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos.

SSR “Simple Sequence Repeats”

STMS “Sequence Tagged Microsatellite Sites”

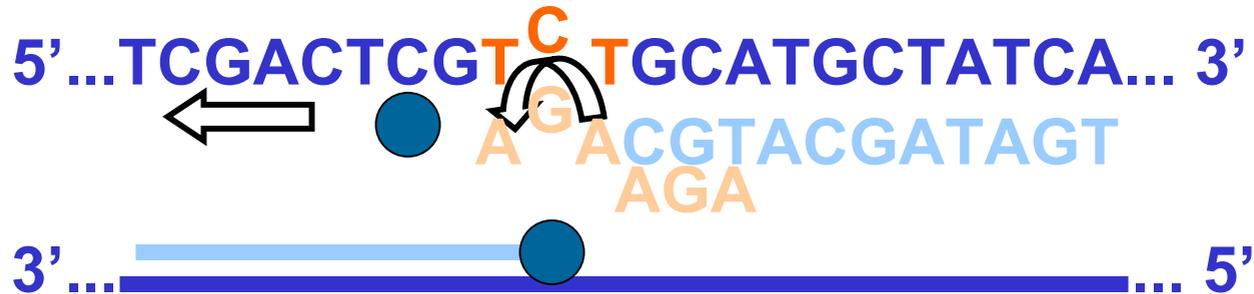
SSRP “Simple Sequence Repeat Polymorphisms”

GENOMA DOS EUCARIOTOS



COMO SURGIRAM OS SSRs ?

Teoria do "SLIPPAGE" OU DESLIZAMENTO DA DNA POLIMERASE



Alça no PAREAMENTO



CARACTERÍSTICAS DOS MICROSSATÉLITES

- I. Apresentam-se flanqueados por seqüências únicas, podendo ser amplificados individualmente através de PCR (sendo, portanto, unilocus e apresentando comportamento co-dominante, onde os heterozigotos podem ser identificados).

- II. Devido a sua natureza altamente repetitiva (e da pequena extensão da unidade de repetição, eles apresentam alto grau de polimorfismo).

- III. São muito freqüentes e encontram-se distribuídos ao acaso, apresentando ampla cobertura no genoma, podendo, portanto, estar associados a seqüências expressas.

CARACTERÍSTICAS DOS MICROSSATÉLITES

I. Apresentam-se flanqueados por seqüências únicas, podendo ser amplificados individualmente através de PCR (sendo, portanto, **UNILOCUS** e apresentando **COMPORTAMENTO CO-DOMINANTE**, onde os heterozigotos podem ser identificados).

Flanqueados por Seqüências Simples

(**ACTTCGACTGCT**) CGCGCGCGCGCGCGCGCGCG (**TCGATCGCCGTAA**)

**REAÇÃO DE PCR SERÃO AMPLIFICADOS APENAS 2 TRECHOS DE DNA,
PERTENCENTES A CADA UM DOS HOMÓLOGOS**



No gel de poliacrilamida poderão ser visualizados no máximo dois fragmentos por indivíduos (2 alelos)

CARACTERÍSTICAS DOS MICROSSATÉLITES

II. Devido a sua natureza altamente repetitiva (e da pequena extensão da unidade de repetição) eles apresentam **ALTO GRAU DE POLIMORFISMO**.

Três fenômenos básicos estariam envolvidos no processo de multialelismo do loco de microssatélite:

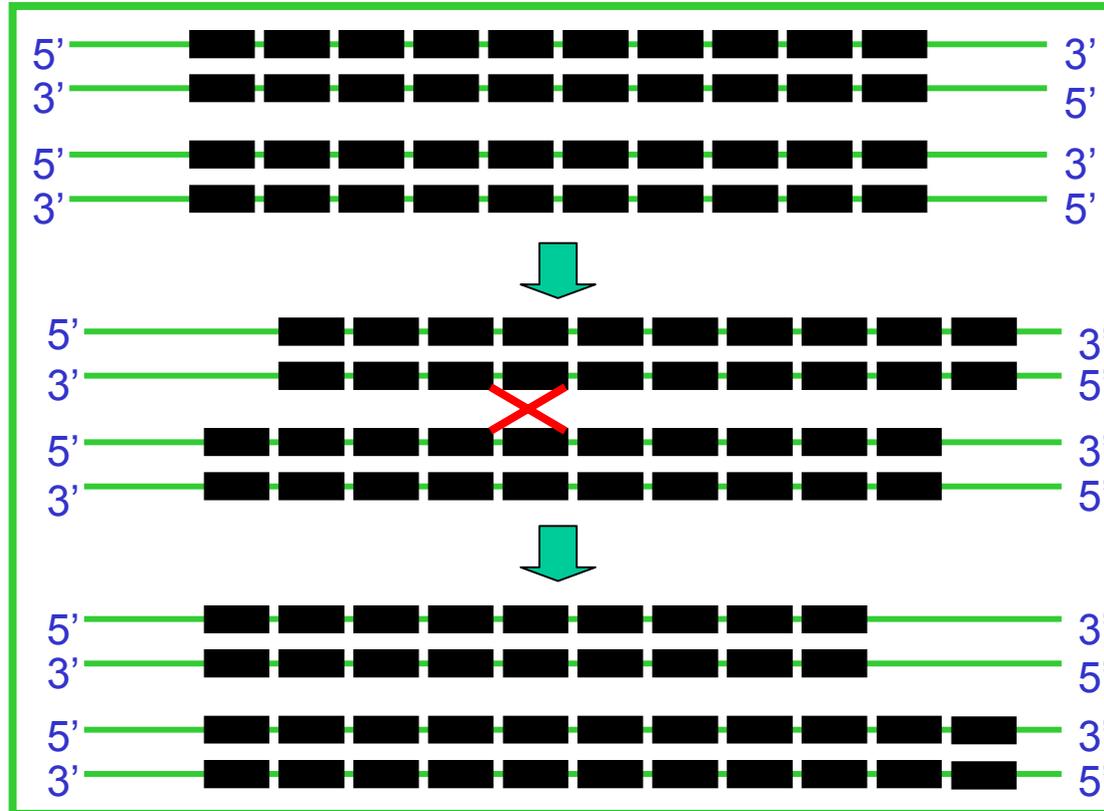
surgimento de novos alelos

Erros da DNA Polimerase (“Slippage”)

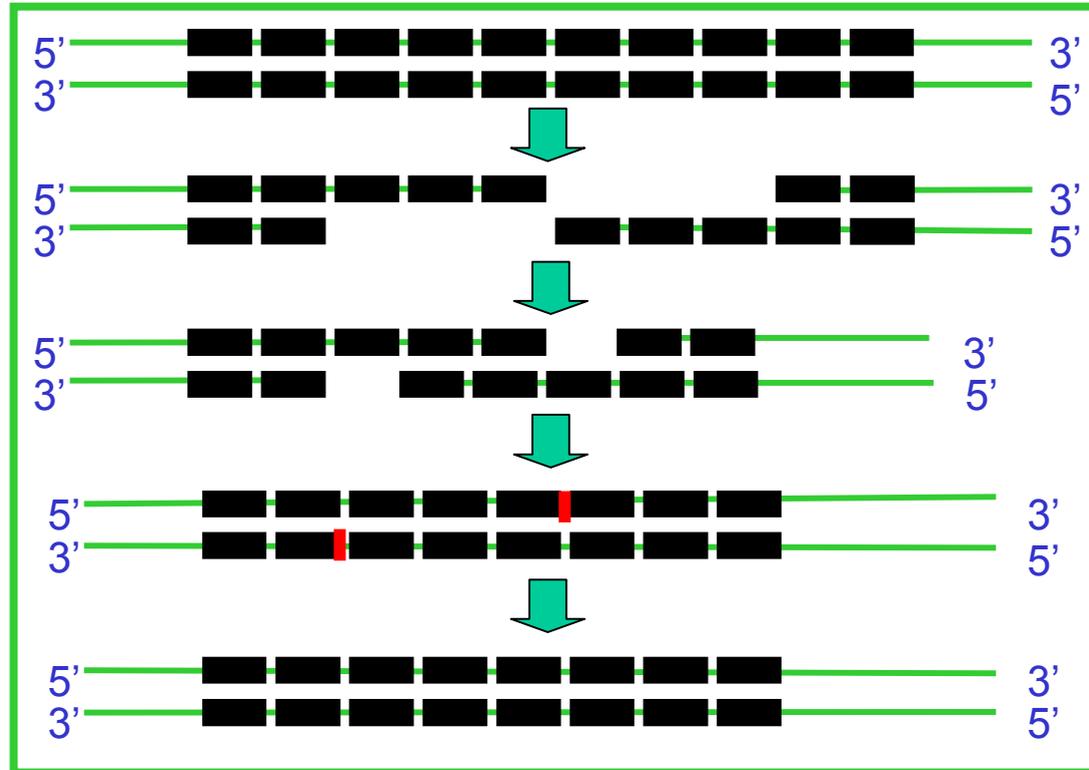
“Crossing-over” ou permuta desigual

Mutação

“CROSSING-OVER” DESIGUAL



DELEÇÃO



PERMUTA DESIGUAL

(ACTTCGACTGCT) CGCGCGCGCGCGCGCGCGCG (TCGATCGCCGTAA)

(ACTTCGACTGCT)CGCGCGCGCG_{CG}CGCGCGCGCG (TCGATCGCCGTAA)

alelo1: (CG)8

alelo2: (CG)9

DELEÇÃO

(ACTTCGACTGCT) CGCGCGCGCGCGCGCGCGCG (TCGATCGCCGTAA)

(ACTTCGACTGCT)CGCGCGCGCGCGCG (TCGATCGCCGTAA)

alelo1: (CG)8

alelo2: (CG)6

CARACTERÍSTICAS DOS MICROSSATÉLITES

III. São muito freqüentes e encontram-se distribuídos ao acaso, apresentando ampla cobertura no genoma, podendo, portanto, estar associados a seqüências expressas.



A classe de marcadores moleculares com maior conteúdo de polimorfismo (PIC “Polymorphism Information Content”)



A seqüência *motif* , ilha ou unidade repetitiva do microssatélite (1 a 6 pb)

- mononucleotídica (G)n
- di- (GA)n
- tri- (GAT)n
- tetra- (GATA)n
- penta- (GATAC)n
- hexa- (GATACA)n

Plantas: (AT)n (Morgante & Olivieri, 1993)

Freqüência de distribuição: 50 mil pb

Mamíferos: (CA)n e (TG)n (Hamada e col., 1982)

MICROSSATÉLITE podem ser classificados:

PERFEITOS

IMPERFEITOS

COMPLEXOS

COMPLEXO-IMPERFEITO

...GTGTGTGTGTGTGTGT ...

...GTGTGT**C**GTGTGTGTG...

...GTGTGT**AAA**GTGTGT...

...GTGT**AAACA**AGTGT...

PARA QUE SERVEM?

- Acessar variabilidade genética em populações naturais ou cativas (COMPORTAMENTO CO-DOMINANTE e ao MULTIALELISMO)
- Estudos de mapeamento genético e físico (FREQUÊNCIA e AMPLA DISTRIBUIÇÃO NO GENOMA, sua ASSOCIAÇÃO C/ SEQÜÊNCIAS EXPRESSAS e ao seu ALTO GRAU DE POLIMORFISMO)
- QTLs (“Quantitative Trait Loci”) e MAS (“Marked Assisted Selection”) (FREQUÊNCIA e AMPLA DISTRIBUIÇÃO NO GENOMA, sua ASSOCIAÇÃO C/ SEQÜÊNCIAS EXPRESSAS e ao seu ALTO GRAU DE POLIMORFISMO)

PARA QUE SERVEM?

São uma rica fonte de polimorfismo genético, constituindo-se num loco altamente variável, multiálico e com grande conteúdo informativo.

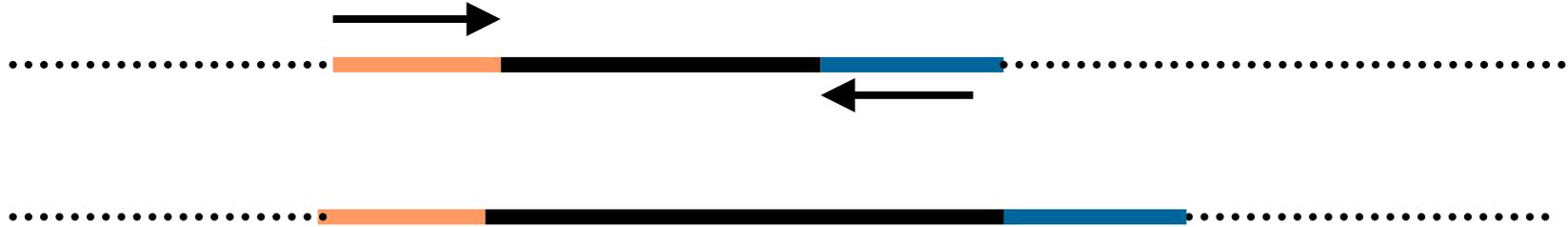
Acessar variabilidade genética em populações naturais ou cativas

Estes estudos, em geral, envolvem a Técnica de PCR

- Identificação os microssatélites na espécie em estudo
- Acessar variabilidade genética em populações naturais ou cativas
- Sintetiza os oligonucleotídeos flanqueadores
- Testa em reações de PCR
- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
- Análise estatísticas: (Frequência Alélica, Heterozigosidade média)

REAÇÃO DE PCR

as regiões flangeadoras do microssatélite são únicas e geram um padrão unilocos



Gel de Poliacrilamida: máximo 2 alelos diferentes/indivíduo

Cromossomo I A



Cromossomo IB

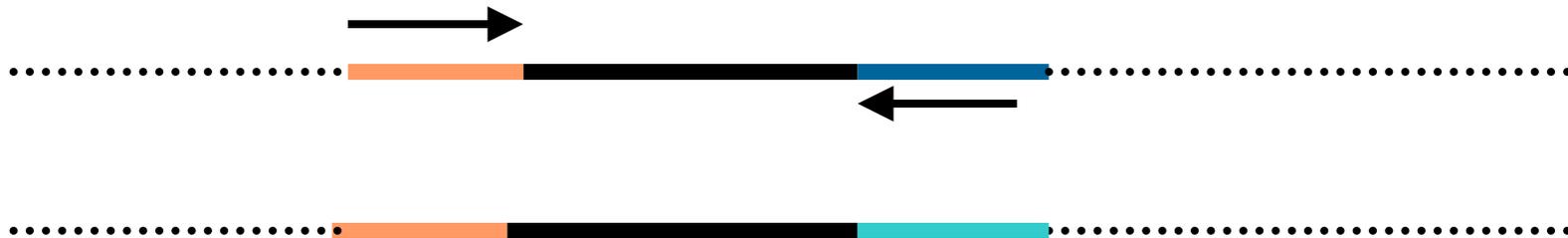


HOMOZIGOTO

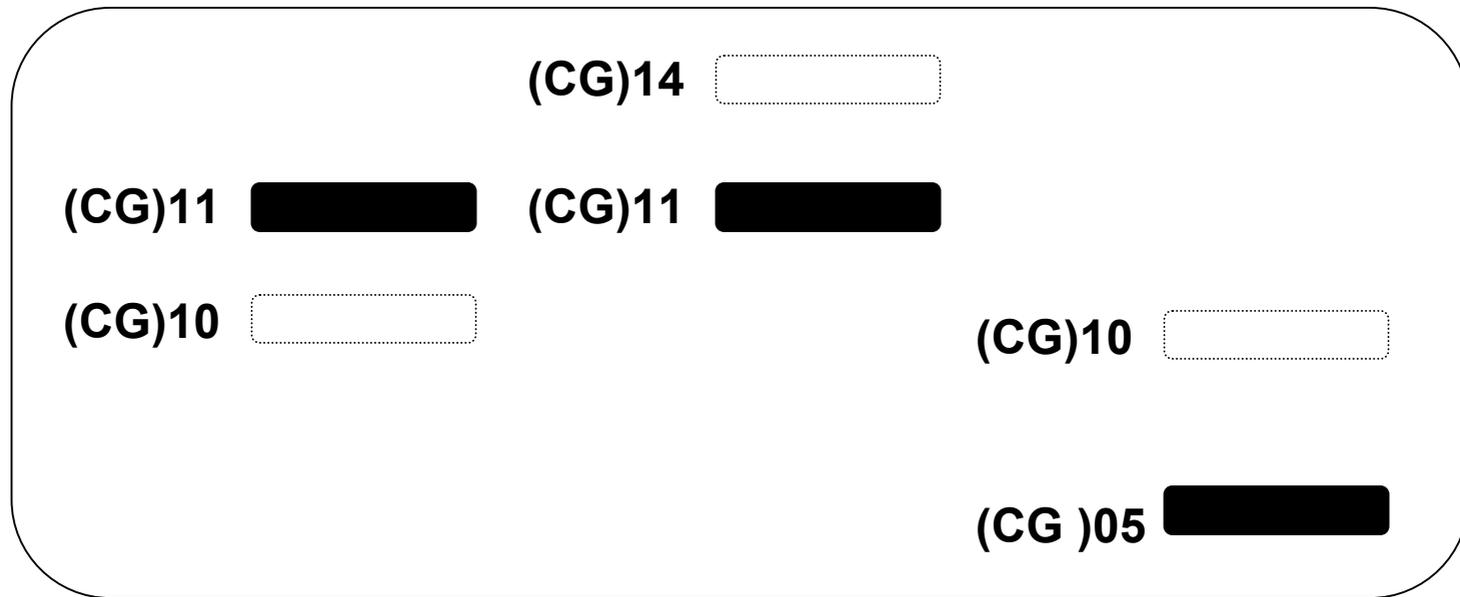
HETEROZIGOTO

DEVIDO A MUTAÇÃO, PERMUTA DESIGUAL E ERROS DA POLIMERASE

ALTO NÚMERO DE ALELOS



OBS: às vezes mutações no sítio de ligação do primer podem impedir a amplificação do alelo, acusando a presença de ALELO NULO



Alelos Nulos

**não ocorre amplificação do DNA,
modificações nas regiões flangeadoras
impedem o anelamento do primer**

ESTUDOS DE CASO

Wolfus e col., 1997 (Aquaculture)

São estudadas seis populações de *Litopenaeus vannamei* cultivadas e nativas

Objetivos

- Determinar a diversidade genética em estoques “SPF” e em estoques selvagens.
- Comparar a diversidade genética entre os estoques selvagens, “SPF” e os estoques candidatos a “SPF”.
- Estabelecer marcas genéticas específicas para as famílias e/ou populações estudadas.

O que são os estoques SPF (“Specific Pathogen Free” ou “High Health”)?

Linhagens consideradas livres de patógenos.

ANÁLISE DE DIVERSIDADE P/ O LOCUS M1

População	NÚMERO DE ALELOS		HETEROZIGOSIDADE %	
	total	exclusivos	observada	esperada
Sinaloa, México ^{SPF/F3}	17	4	97,6	90,9
Equador ^{F7}	4	0	45,0	38,0
Híbrida ^{SPF/F1}	8	1	96,6	80,0
Oxaca, México ^{F1}	23	8	100	93,6
Guatemala ^{F1}	6	0	100	78,1
Salinas ^s	22	10	100	93,5
Total	47	23	98,1	94,2

A diversidade genética p/ o locus M1 foi alta

$$H_{ob} > H_e$$

PROVÁVEL EXPLICAÇÃO P/ A ALTA HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA:



O locus apresenta uma alta taxa de mutação

Presença de alelos nulos poderia estar interferindo na análise dos dados



QUAIS SÃO AS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MARACADORES DE MICROSSATÉLITES?

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA

APLICAÇÃO DO MÉTODO PIMA

“PCR Isolation of Microsatellites Arrays”

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA

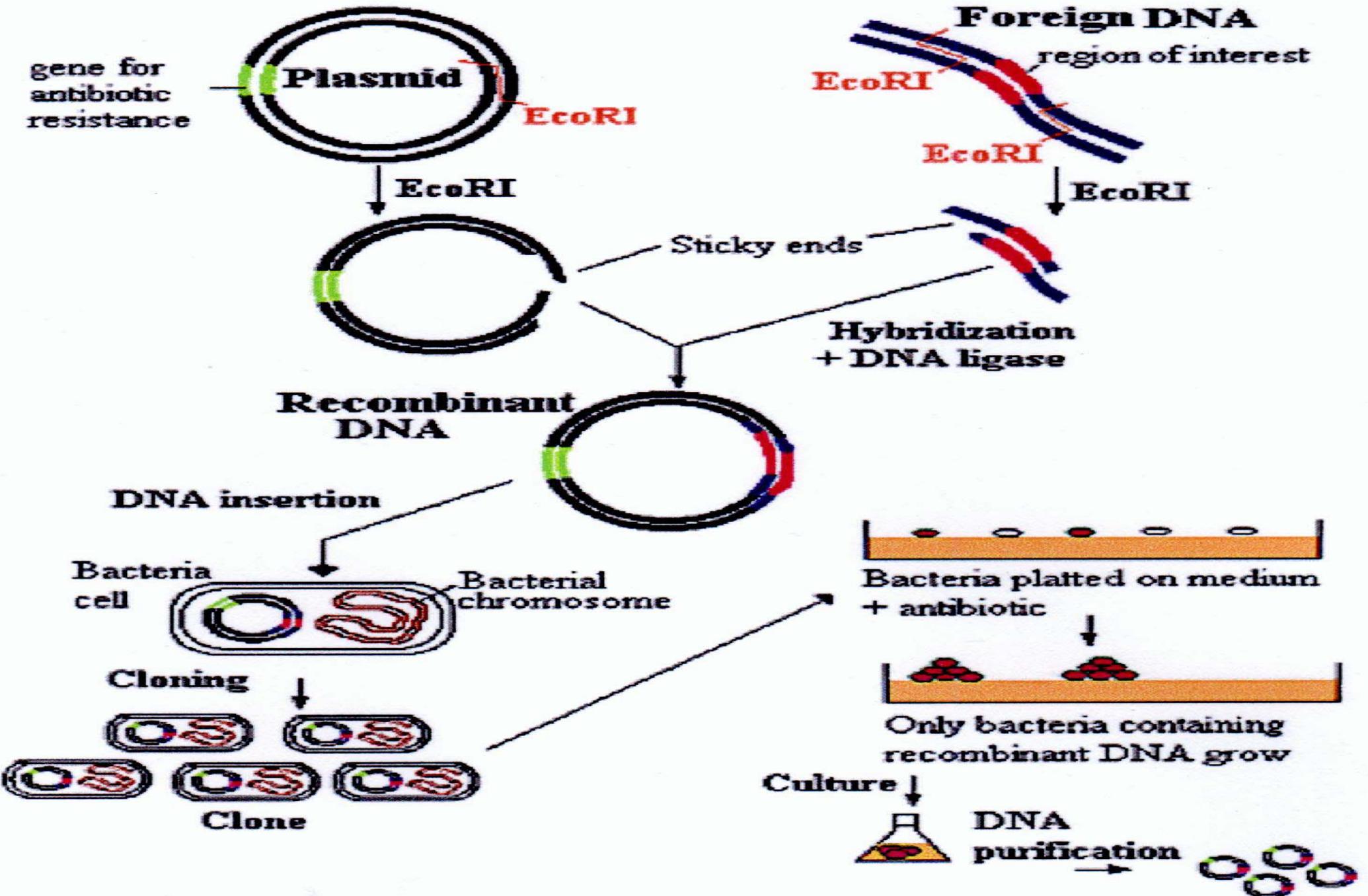
Extração de DNA genômico e Clivagem com Enzima de Restrição

**Construção da
Biblioteca Total**

**Construção da
Biblioteca Parcial**

Construção da Biblioteca

- 1) Clivagem do DNA c/ ENZIMA de restrição: Clonagem os Fragmentos de DNA que supostamente terão as seqüências de microssatélites
- 2) Prepara o vetor que vai incorporar o seu fragmento de DNA. O plasmídeo deve ser clivado com a mesma enzima utilizada na digestão do DNA. Ligação entre o fragmento de DNA e o plasmídeo (DNA ligase)
- 3) Clonagem: Inserção dos plasmídeos recombinantes em células de bactérias. As bactérias são colocadas em condições adequadas p/ que haja proliferação. Feita uma triagem das colônias utilizando com sondas de microssatélites.
- 4) Os clones positivos são purificados e sequenciados.
- 5) Após a confirmação da presença de um microssatélites, estes deverão ser validados.



Em geral não se costuma a fazer Biblioteca Genômica Total

apenas uma parte dos fragmentos digeridos é selecionada

Biblioteca Genômica Parcial

- 1) Digere o DNA genômico**
- 2) Corre o DNA em gel de agarose (rastros)**
- 3) “Southern Blot” (transferência do DNA para uma membrana e hibridação com sonda de microssatélite).**
- 4) Detecção (autoradiografia)**
- 5) Novo gel de agarose com DNA digerido**
- 6) Eluição do DNA na região no gel que corresponde à marcação positiva na membrana.**
- 7) DNA é purificado, clonado e sequenciado**

ESTUDO DE CASO

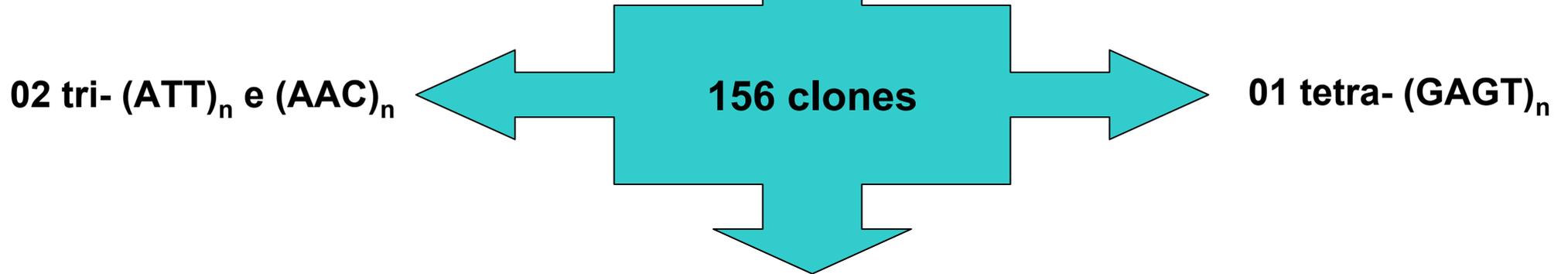
Tassanakajon e col., 1996 (*Mol. Mar. Biolog. And Biotechnology*)

- **Populações selvagens de *P. monodon***
 - **Mar de Adam, Província de Satun (Sul da Tailândia)**
 - **Extração de DNA (pleópodos)**
 - **Digestão do DNA genômico (Alu I, Hae III, Hinc II, Rsa I)**
 - **Gel de Agarose 1,5%**
 - **Seleção dos fragmentos (300 a 700 pb)**
 - **Eluição e Purificação**
 - **Construção da Biblioteca Genômica Parcial**
 - **Sourthen Blot (transferência e hibridação em membrana)**
- sondas utilizadas (GT)₁₅ e (CT)₁₅ (³²P)**

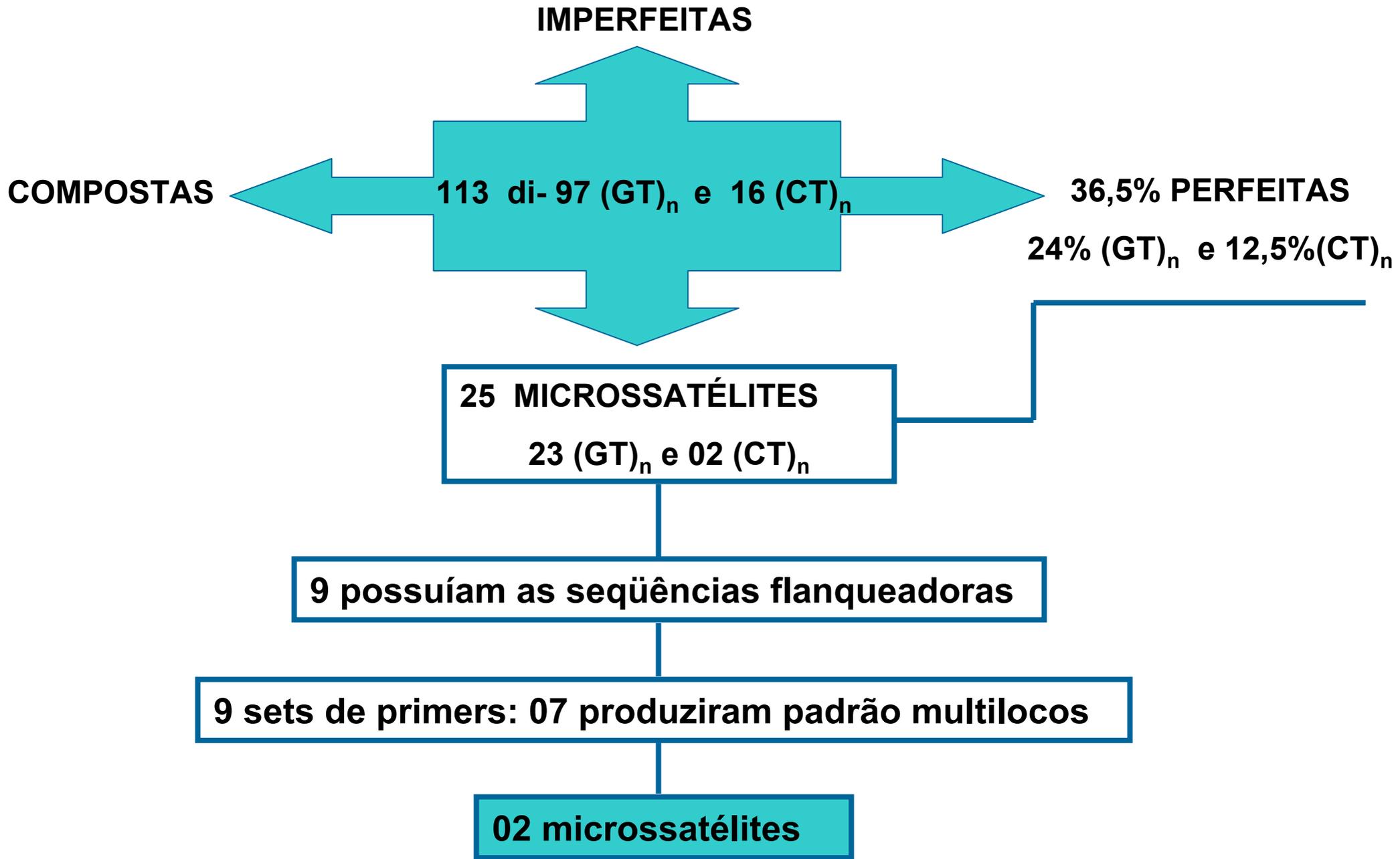


poucos mononucleotídeos $(A)_n$ e $(G)_n$

27 di- $(AT)_n$



113 di- 97 $(GT)_n$ e 16 $(CT)_n$



MÉTODO PIMA

Isolar seqüências de Microsatélites resultantes de ampliações de DNA via PCR

- 1) Reação de PCR (utilizando primers de RAPD).
- 2) Purifica o produto de Amplificação.
- 3) Clonagem dos fragmentos e Seleção dos clones recombinates.
- 4) PCR utilizando primers de microssatélites e primers flanqueadores do inserto (enzima de restrição).
- 5) Corre o produto de amplificação em gel de agarose e faz a detecção (fragmento extra de menor tamanho).
- 6) Seleciona estes clones e faz o Sequenciamento.

Por que primers de RAPD ?

- 1) produz um alto número de fragmentos por indivíduo
- 2) os fragmentos produzidos encontram-se relacionados com seqüências microssatélites

(como se costuma usar um único primer, os produtos resultantes de amplificação via RAPD-PCR encontram-se flanqueados por seqüências que provavelmente sofreram um processo de duplicação e posteriormente inversão)

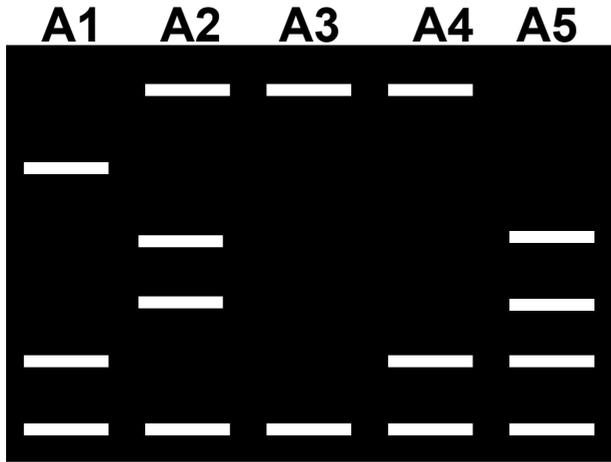
PROBABILIDADE DE CONTER MICROSSATÉLITE É ALTA !!!!

TAG TCGA TACG

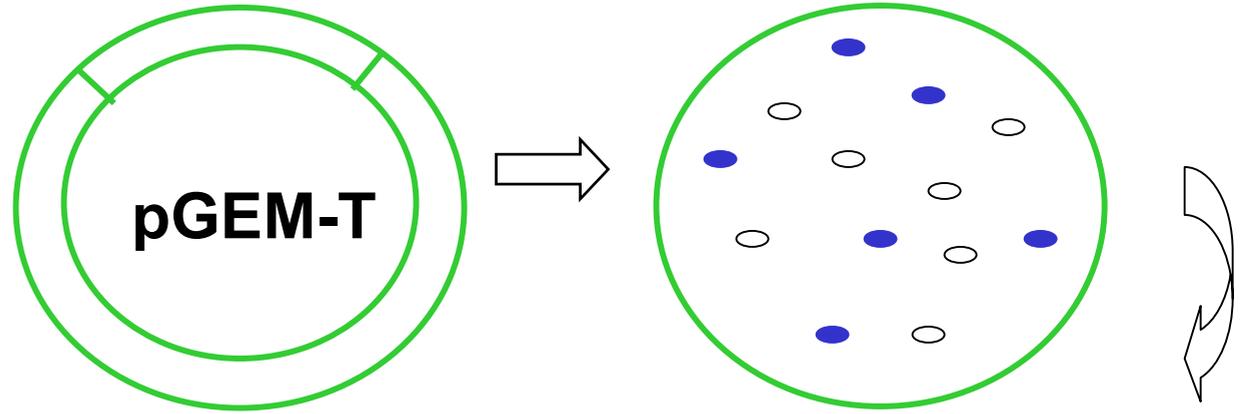
(duplicação) TAG TCGA TACG CGC TAG TACG

(inversão) TAG TCGA TACGGCAT AGCT GAT

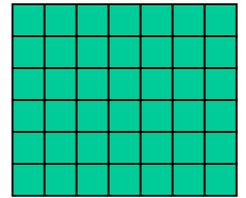
1 - RAPD



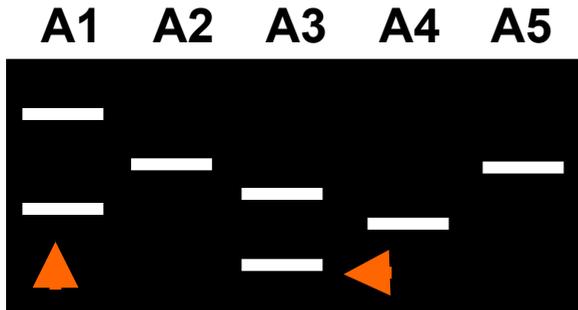
2 - CLONAGEM



Transfere as colônias brancas para "megaplate" (96) com meio

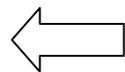


5 - SEQÜENCIAMENTO

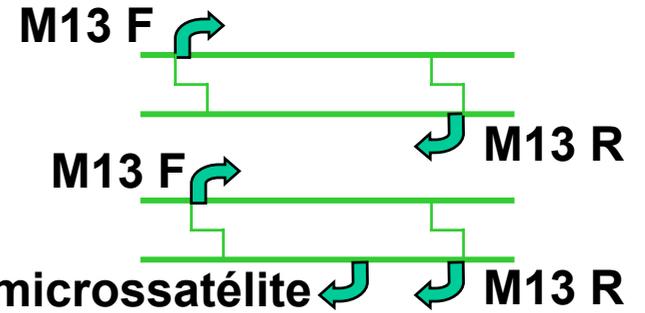


4 - DETECÇÃO

3 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR



Primers p/ amplificar o inserto total



Mais recentemente a análise de DATAMINING também tem se mostrado uma ferramenta importante para identificação e caracterização de seqüências microssatélites no genoma de diversas espécies



O método de DATAMINING consiste na busca eletrônica de informações de interesse a partir de uma análise criteriosa e minuciosa utilizando diferentes recursos de Bioinformática.

A análise de Seqüências Expressas Marcadas (ESTs), têm possibilitado o desenvolvimento de marcadores SSR de um modo simples e direto.

Entretanto, a identificação de SSRs-ESTs é limitada para espécies com bancos de dados que possuam ESTs disponíveis

Em *L. vannamei* análises de DATAMINING vêm sendo realizadas a partir de ESTs depositados no banco de dados do Projeto ShEST

Por que buscar seqüências microssatélites no genoma de camarão?

Identificar Loci relacionados a Características Quantitativas de interesse econômico (QTLs) e a partir daí desenvolver um modelo de Seleção Auxiliada por Marcadores (MAS)

- **Identificar o maior número de marcadores polimórficos na espécie.**
- **Desenvolver linhas puras fenotipicamente divergentes**
- **Realizar cruzamentos dirigidos**
- **Fazer a genotipagem das linhagem**
- **Fazer a análise de segregação dos loci**
- **Construir mapas de ligação**
- **Correlacionar o marcador com a característica de interesse**

Desenvolvimento de Mapas de Ligação e
Identificação de QTLs (Locos de Caracteres Quantitativos)

Desenvolvimento de um Modelo para Seleção Auxiliada por
Marcadores (Mas) em *Litopenaeus vannamei*



Subsidiar melhorias na atividade de cultivo de camarões

IDENTIFICAÇÃO DE QTLs

PRIMEIRO PASSO:

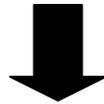
Ampla varredura genômica: Identificar o maior número de marcadores moleculares na espécie.



Marcadores deverão ser utilizados na genotipagem das linhagem

SEGUNDO PASSO:

Desenvolver linhas puras fenotipicamente divergentes



Realizar cruzamentos dirigidos

IDENTIFICAÇÃO DE QTLs

duas linhas puras com características completamente divergentes

P: CC x LL

F1: CL

CL x CL

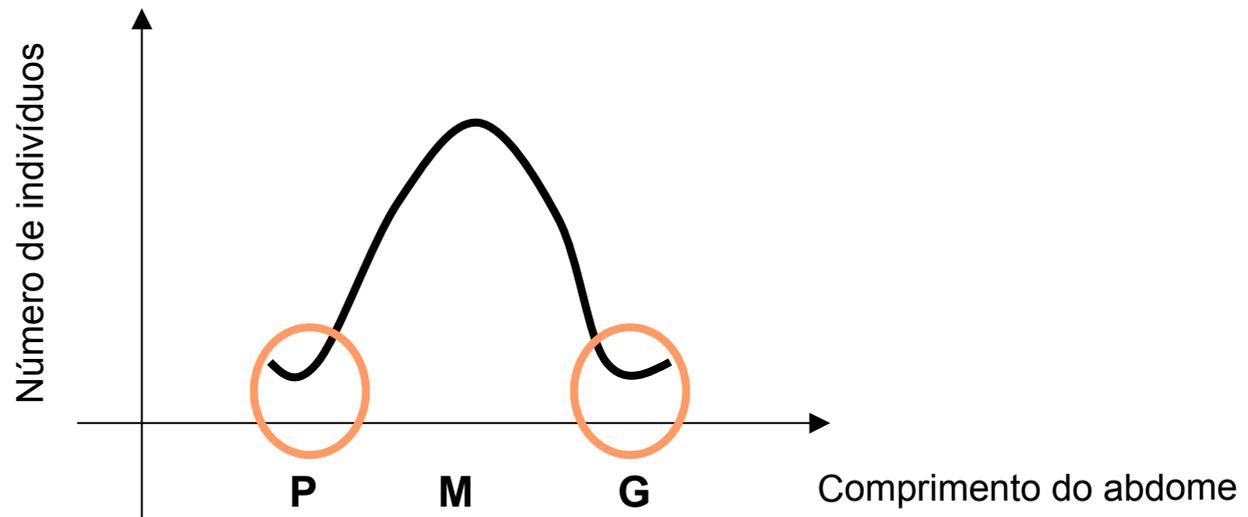
F2: análise da prole

Por isso é importante haver variação !!!!

IDENTIFICAÇÃO DE QTLs

TERCEIRO PASSO:

Testar os marcadores de microssatélites na prole, fazer a genotipagem e analisar a segregação destes marcadores na população, associando com uma dada característica.



Cruzamento entre os heterozigotos

Análise de segregação na F2:



Ex: Analisando 4 marcadores (ABCD)

Aa x Aa

Bb x Bb

Cc x Cc

Dd x Dd

segregação mendeliana esperada

Tx de recombinação

os desvios observados indicam se há ligação entre os locos analisados