



Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal



Protocolo para PCR com Marcadores SSR marcados indiretamente através de Adaptador M13

Modificado de Schuelke M (2000)

O protocolo apresenta duas alterações em relação à amplificação regular de SSR nuclear:

1. Há dois *primers* F na reação: o específico, com cauda M13, e o adaptador M13 ligado ao fluoróforo. O *primer* F-M13 está presente em menor concentração que o *primer* R.
2. Está inserido na PCR um segundo passo com oito ciclos em temperatura otimizada para o anelamento do *primer* F marcado.

Volumes e concentrações dos reagentes:

Para um volume final de 25 μ l:

Reagente	Conc. inicial	Conc. final	Volume (μ l)
DNA	10-20 ng/ μ l	0,4-0,8 ng/ μ l	1,00
TBT	5 x	1 x	5,00
Tampão da Taq Tris-HCl	10 x	1 x	2,50
Cloreto de magnésio (MgCl ₂)	50 mM/ μ l	1,5 mM	0,75
dNTP	10 mM/ μ l	0,25 mM	0,625
<i>Primer</i> F-M13	10 μ M/ μ l	0,125 μ M	0,3125
<i>Primer</i> R	10 μ M/ μ l	0,5 μ M	1,25
Adaptador-M13 marcado (6-FAM, VIC, NED ou PET)	10 μ M/ μ l	0,5 μ M	1,25
Taq DNA-Polimerase	5 U/ μ l	0,0312 U/ μ l	0,156
Água destilada			12,1565

Programação do termociclador:

1. Desnaturação Inicial: 5 min 94°C

2. Anelamento do *primer* F-M13: 30 ciclos

30s 94°C
45s 55-65°C
45s 72°C

3. Anelamento do adaptador-M13 marcado: 8 ciclos

30s 94°C
45s 53°C
45s 72°C

3. Extensão final: 10 min 72°C

Modificado de: Schuelke M (2000) *An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments*. Nat Biotechnol 18:233-234.