

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Caracterização preliminar de genes candidatos potencialmente associados com características de produção em búfalo¹

Nedenia Bonvino Stafuzza², Mariana Maciel Borges³, M. Elisabete Jorge Amaral⁴

¹Trabalho financiado pela FAPESP

²Pós-doutoranda do Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP. Bolsista FAPESP. e-mail: nedeniabs@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Bolsista CAPES. e-mail: marianamborges@gmail.com

⁴Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP. e-mail: amaral@ibilce.unesp.br

Resumo: Entre os 3.000 marcadores mapeados no genoma bubalino, os genes FABP3, S1PR1 e SST mostraram-se de grande interesse por apresentarem polimorfismos associados com depósito de gordura subcutânea, marmoreio e características de crescimento em bovino. Visando o início do desenvolvimento de estudos dos genes FABP3, S1PR1 e SST em búfalo, esse trabalho teve como objetivo a caracterização molecular desses genes a partir de uma biblioteca genômica construída com DNA de búfalo. A identificação de clones da biblioteca contendo esses genes foi realizada por meio das técnicas de PCR e eletroforese. Os clones identificados como positivos para esses genes foram então purificados e sequenciados por pirosequenciamento. Os resultados gerados serão utilizados na identificação de SNPs associados com características de produção nas diferentes raças de búfalos, fornecendo subsídios para um melhor entendimento da variabilidade genética presente nos rebanhos bubalinos.

Palavras-chave: biblioteca genômica, FABP3, marmoreio, pirosequenciamento, S1PR1, SST

Preliminary characterization of candidate genes potentially associated with production traits in buffalo

Abstract: Among the 3,000 markers mapped on buffalo genome, FABP3, S1PR1 and SST genes showed a great interest since they have polymorphisms associated with back fat thickness, marbling, and growth traits in cattle. In order to develop the studies of FABP3, S1PR1 and SST genes on buffalo, this study aimed to characterize these genes from a genomic library constructed with buffalo DNA. The identification of clones was performed by PCR and electrophoresis techniques and the positive clones were purified and sequenced by pyrosequencing. The results will be applied to identification of SNPs markers associated with production traits in several breeds of buffaloes, providing a better understanding of genetic variability present in buffalo herds.

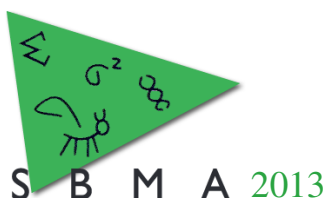
Keywords: FABP3, genomic library, marbling, pyrosequencing, S1PR1, SST

Introdução

Nos últimos anos, a comunidade científica tem reunido esforços para ampliar os conhecimentos sobre o genoma bubalino, utilizando ferramentas genômicas para estudos em larga-escala. Entre os trabalhos realizados, destaca-se a geração de mapas do genoma do búfalo onde foram localizados cerca de 3.000 marcadores em todo o genoma (Amaral et al., 2008; Stafuzza et al., 2009).

A mais recente ferramenta genômica disponível para estudos do genoma do búfalo em larga escala consiste em uma biblioteca genômica a qual é composta por uma coleção de clones contendo fragmentos de DNA bubalino inseridos em um vetor de clonagem (Stafuzza et al., 2012). A exploração dessa ferramenta possibilita a caracterização molecular de qualquer gene de interesse econômico, auxiliando a sua anotação. A partir da caracterização molecular de genes, as sequências de DNA obtidas podem ser utilizadas tanto para o estudo de SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) via sequenciamento ou para o desenho de chips de SNPs de média e alta densidade.

Entre os mais de 3.000 marcadores mapeados no genoma bubalino, os genes FABP3 (*fatty acid binding protein 3, muscle and heart*), S1PR1 (*sphingosine-1-phosphate receptor 1*) e SST (*somatostatin*) despertaram um grande interesse por apresentarem polimorfismos associados com características de produção em bovino, incluindo polimorfismos associados com depósito de gordura subcutânea (Cho et



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

al., 2007), marmoreio (Yamada et al., 2009) e características de crescimento (Gao et al., 2011), respectivamente.

Visando iniciar o desenvolvimento de estudos com os genes FABP3, S1PR1 e SST em búfalo, esse trabalho teve como objetivo a caracterização molecular desses genes a partir da identificação e sequenciamento de clones provenientes da biblioteca genômica de búfalo.

Material e Métodos

A identificação de clones da biblioteca genômica de búfalo contendo os genes FABP3, S1PR1 e SST foi realizada por meio de reações de PCR, utilizando os pares de *primers* descritos em Amaral et al. (2008). As reações de PCR foram realizadas em três etapas, seguindo o modelo de organização e armazenamento dos clones da biblioteca genômica de búfalo, descrito por Stafuzza et al. (2012).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μ L utilizando 0,2 mM de cada *primer*, 100 mM de dNTPs; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U da DNA polimerase AmpliTaqGold™ (*Life Technologies*) e 2 μ L do material biológico dos clones previamente submetidos a 98°C por 15 minutos para quebra da parede celular. Os ciclos para amplificação utilizados foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 50-56°C (dependendo do par de *primers*) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida de uma extensão final a 72°C por 6 minutos.

A qualidade dos produtos de PCR obtidos foi visualizada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese horizontal em tampão TBE 0,5X a 120 V durante 40 minutos. Os resultados foram fotodocumentados com câmera digital do tipo DC290 Kodak™.

Identificados os clones positivos para os genes de interesse, seguiu-se com os experimentos para extração de DNA dos mesmos, utilizando o kit PhasePrep™BAC DNA (*Sigma-Aldrich*). Após a extração e purificação do DNA dos clones, os mesmos foram quantificados e preparados para o pirosequenciamento (*454-Roche*).

Resultados e Discussão

A busca na biblioteca genômica por clones contendo os genes FABP3, S1PR1 e SST resultou na identificação de três clones, sendo um clone positivo para cada gene-alvo. Os clones foram purificados e sequenciados via pirosequenciamento.

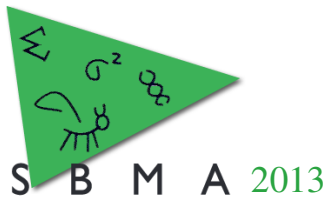
A Tabela 1 apresenta o cromossomo bubalino que esses genes foram mapeados e a sequência dos pares de *primers* utilizados na identificação dos clones positivos com as respectivas temperaturas de anelamento.

Tabela 1. Sequência dos pares de *primers* para PCR utilizados na identificação dos clones de interesse com suas respectivas temperaturas de anelamento

Gene	Cromossomo	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Temperatura de anelamento
FABP3	BBU2q	F: GTTCCTTCTCAGGCAGTGGCTT R: CAGTGGTTCCTGTGACAGGGTA	56°C
S1PR1	BBU6	F: TGGCCCTCTCAGACCTGTTG R: TGGCGAGGAGACTGAACACG	50°C
SST	BBU1q	F: CATGTTTACGGTTGCGAAAGG R: GGGTCTTATTGAGGATTGGAG	50°C

Os pares de *primers* utilizados na identificação dos clones positivos para os genes FABP3, S1PR1 e SST da biblioteca genômica de búfalo também podem ser utilizados para qualquer estudo de variabilidade genética desses genes em rebanhos das diferentes raças de búfalo, tornando-se assim uma ferramenta de grande utilidade para a comunidade científica.

Estudos de variabilidade são indispensáveis para avaliar a diversidade genética dos animais do rebanho, além de tornar possível a criação de um painel de SNPs, permitindo estudos de associação de marcadores moleculares com características de produção.



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

A caracterização molecular dos genes FABP3, S1PR1 e SST em búfalo permitirá a identificação de novos SNPs, os quais poderão ser utilizados em estudos de associação com características de produção.

Conclusões

A caracterização molecular dos genes FABP3, S1PR1 e SST em búfalo os tornam potenciais genes candidatos para estudos de variabilidade genética associados com características de produção nos rebanhos bubalinos, o que permitirá a identificação de polimorfismos associados com a diversidade funcional, agregando conhecimentos para o desenvolvimento de estratégias de seleção para tais características.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido à Profa. Dra. M. Elisabete J. Amaral para a realização desse trabalho (Processo: 2011/11889-3) e pela bolsa de pós-doutorado concedida à Dra. Nedenia B. Stafuzza (Processo: 2011/02478-0).

Literatura citada

- AMARAL, M.E.J.; GRANT, J.R.; RIGGS, P.K. et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v.9, 2008.
- CHO, S.; PARK, T.S.; YOON, D.H. et al. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB Reports**, v.41, p.29-34, 2008.
- GAO, L.; ZAN, L.S.; WANG, H.B. et al. Polymorphism of somatostatin gene and its association with growth traits in Chinese cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.703-711, 2011.
- STAFUZZA, N.B.; ABASSI, H.; GRANT, J.R. et al. Comparative RH maps of the river buffalo and bovine Y chromosomes. **Cytogenetic and Molecular Research**, v.126, p.132-138, 2009.
- STAFUZZA, N.B.; ABBEY, C.A.; GILL, C.A. et al. Construction and preliminary characterization of a river buffalo bacterial artificial chromosome library. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p.3013-3019, 2012.
- YAMADA, T.; SASAKI, S.; SUKEGAWA, S. et al. Novel SNP in 5'flanking region of EDG1 associated with marbling in Japanese Black beef cattle. **Animal Science Journal**, v.80, p.486-489, 2009.