

Genotipagem de SNPs em genes candidatos a características de interesse comercial em bovinos de corte com sondas de hidrólise

Raissa Camacho Dalla Déa¹; Vitor Catoia²; Polyana Cristine Tizioto²; Marina Ibelli Pereira Rocha²; Luciana Correia de Almeida Regitano³; Simone Cristina Méo Niciura³

¹Aluna de graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, bolsista PIBIC-CNPq; raissadalladea@gmail.com;

²Alunos de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP;

³Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

A bovinocultura de corte busca obter produto final (carne) de qualidade por meio da seleção, tradicional ou assistida por marcadores moleculares, para características de interesse comercial, com destaque ao desenvolvimento muscular e à maciez da carne. A μ -calpaína (codificada pelo gene *CAPNI*) é a principal enzima responsável pelo amaciamento do músculo esquelético no período pós-mortem, pois promove a degradação das miofibrilas. O gene *MYOD1* tem a função de ativar a transcrição de genes específicos do músculo e, por isso, participa no desenvolvimento muscular, na regeneração de tecido e na diferenciação dos mioblastos. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar polimorfismos do tipo SNP (single-nucleotide polymorphism) nos genes *CAPNI* (GeneID: 281661; SNP: rs17872099, G>A, éxon 5) e *MYOD1* (GeneID: 281938; SNP G>A, éxon 3/5'UTR, posição 1.996 bp) em bovinos, para posterior estudos de epigenética, incluindo avaliação de expressão gênica específica de alelo, genótipo e origem parental. Amostras de útero materno e pele fetal obtidas de 34 úteros gravídicos bovinos coletados em abatedouro foram destinadas à extração de DNA com solvente orgânico. O DNA obtido foi avaliado quanto à quantidade e à qualidade (razão entre absorbâncias 260/280) em NanoDrop ND-1000. A seguir, as amostras foram destinadas à genotipagem por discriminação alélica em PCR em tempo real (ABI Prism 7500) utilizando-se o sistema TaqMan, que consiste de primers e sondas de hidrólise alelo-específicas. As reações consistiram de 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix, 1X de ensaio TaqMan e 15 ng de DNA genômico, em volume final de μ L. A reação foi iniciada com o ensaio de discriminação alélica *pre-read* (60°C por 1 min), seguida por amplificação por quantificação absoluta (desnaturação a 95°C por 10 min e 45 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min) e leitura *post-read* para a designação dos alelos. Para o SNP do gene *CAPNI*, só foram encontrados animais (mães e fetos) com o genótipo AA e, devido à ausência de variabilidade genética nas amostras avaliadas, esse SNP não pode ser utilizado para os estudos de epigenética e expressão gênica diferencial. Para o SNP do gene *MYOD1*, apesar de terem sido feitos diversos testes com diferentes concentrações de DNA e de ensaio TaqMan e volumes finais de reação, não foi possível determinar os genótipos devido ao nível de amplificação abaixo do limite necessário para a discriminação alélica ou à atribuição de genótipo heterozigoto mesmo para amostras conhecidamente homozigotas. Isso indica que o ensaio TaqMan utilizado não foi eficiente para a genotipagem, e novo ensaio terá que ser encomendado e desenhado. Assim, conclui-se que é necessário que em todo experimento de genotipagem com sondas de hidrólise, sejam incluídas amostras de genótipo conhecido, determinado por meio de outra técnica de genotipagem como microarranjo ou sequenciamento, para a validação dos resultados obtidos.

Apoio financeiro: CNPq (processo 120869/2011-0) e FAPESP.

Área: Biotecnologia