

## POLIMORFISMO *AluI* NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA $\kappa$ -CASEÍNA

Marina D. Tambasco<sup>1</sup>, Ana Paula F. Serrão-Semencato<sup>1</sup>, Luiz L. Coutinho<sup>2</sup>,  
Andréa S. de Barros<sup>3</sup>, Luciana C. de A. Regitano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução – UFSCar, São Carlos, SP

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP, Piracicaba, SP

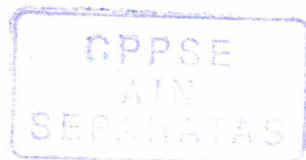
<sup>3</sup>Embrapa Pecuária Sudeste. Caixa Postal 339, CEP 13560-970, São Carlos, SP

### RESUMO

Diversos polimorfismos têm sido descritos para o gene da  $\kappa$ -caseína, tanto na região codificadora quanto na região promotora. Algumas dessas variantes genéticas foram relacionadas à diferenças de produção e qualidade do leite. Com a finalidade de identificar polimorfismos na região flanqueadora da extremidade 5' desse gene, o DNA de 51 animais da raça Jersey foi analisado quanto à presença de polimorfismos de restrição para as endonucleases *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* e *MspI* em um segmento compreendido entre os nucleotídeos -1.073 e -488. Um novo polimorfismo de restrição para a enzima *AluI* foi caracterizado pela presença de dois alelos codominantes. Um dos alelos, *CSN3-1*, não apresentou sítio de restrição para *AluI*, enquanto que o segundo (*CSN3-2*) apresentou dois fragmentos de 116 e 469 pares de bases. As frequências observadas dos alelos 1 e 2 na amostra de Jersey foram 0,44 e 0,56, respectivamente. Esse polimorfismo poderá ser útil na composição de haplótipos para análise de associação com características de produção e qualidade do leite.

### INTRODUÇÃO

A correlação entre marcadores moleculares e características de produção tem sido investigada em várias espécies de interesse econômico. O objetivo desses estudos é a obtenção de marcadores que possam ser utilizados nos programas de seleção para a identificação mais precisa de genótipos superiores. Muitos autores sugerem que algumas das variações das proteínas do leite estão associadas à características diferenciadas deste produto, no que diz respeito ao seu processamento para a fabricação de queijos. A  $\kappa$ -caseína é controlada por um loco com dois alelos principais, A e B (Damiani et al., 1990). A identificação desses alelos pela técnica de PCR-RFLP foi descrita simultaneamente por Zadworny & Kuhnlein (1990) e Medrano & Aguilar-Cordova (1990). Um polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) é também utilizado na identificação dos genótipos de  $\kappa$ -caseína e possui a vantagem de dispensar o uso das endonucleases de restrição. Duas outras formas, C e E, foram descritas, sendo que o alelo C difere do B por uma única substituição de histidina por arginina na posição 97. A variante E é homóloga à A, possuindo uma serina na posição 155 ao invés de uma glicina (Miranda et al., 1993). Além das variantes descritas na região codificadora, Schild et al. (1994) identificaram variantes na região flanqueadora da extremidade 5' do gene da  $\kappa$ -caseína utilizando sequenciamento em 13 animais pertencentes a 7 raças diferentes, incluindo uma raça zebuína. No presente trabalho, a região promotora do gene da  $\kappa$ -caseína foi analisada quanto à presença de mutações presentes dentro de sítios de ligação para fatores



de transcrição, com a finalidade de identificar novos polimorfismos que possam ser utilizados na análise de associação entre essas variantes e características de interesse econômico na produção animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Animais:* Foram utilizados 51 animais da raça Jersey

*Extração de DNA de amostras de sangue fresco:* Amostras de sangue foram obtidas por punção da jugular em tubos para coleta à vácuo, contendo EDTA como anti-coagulante. O DNA foi extraído utilizando-se o método descrito por Olerup & Zetterquist (1992), modificado por Regitano (com.pessoal). O material foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

*Primers:* Os primers utilizados para amplificação do fragmento compreendido entre os nucleotídeos -1.073 e -488 do gene da  $\kappa$ -caseína foram descritos por Schild et al. (1994).

*Investigação de polimorfismos na região promotora:* O segmento de 585 pb foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Cada reação foi constituída de aproximadamente 200 ng de DNA em um volume de reação de 25  $\mu$ l, contendo 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Tris-HCl pH8,4; 0,2  $\mu$ M de cada dNTP; 0,4  $\mu$ M de cada um dos primers e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase e os primers descritos. Os produtos de PCR foram submetidos à análise de restrição com as seguintes endonucleases: *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* e *MspI*. Os fragmentos resultantes das reações de digestão com as enzimas de restrição foram separados em géis de agarose de baixo ponto de fusão a 3% contendo brometo de etídio a 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-borato-EDTA a 5 V/cm. Após a eletroforese, o gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta. O padrão de tamanho de DNA dupla fita  $\phi$ X174 – *HaeIII* foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um polimorfismo de restrição para a endonuclease *AluI* foi observado em animais da raça Jersey, caracterizando a presença de dois alelos codominantes na população. Um dos alelos, *CSN3-1*, não apresentou sítio de restrição para a endonuclease *AluI*, enquanto que o segundo alelo (*CSN3-2*) foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição com 116 e 469 pares de bases. As frequências observadas dos alelos 1 e 2 na amostra de Jersey, composta por 51 animais, foram 0,44 e 0,56, respectivamente. Entretanto essa estimativa deve ser confirmada em uma amostra maior da população, visto que a maioria dos animais estudados é relacionada a um único touro na terceira geração. O polimorfismo descrito poderá ser útil para a composição de haplótipos em combinação com polimorfismos de exon para a análise de associação entre essas variantes genéticas e características de produção e qualidade do leite. Uma análise mais abrangente está sendo conduzida com a finalidade de determinar a ocorrência desse polimorfismo em outras populações de bovinos. Além disso, em virtude de sua localização na região promotora do gene, será investigada a possível influência dessa variação na taxa de expressão do gene da  $\kappa$ -caseína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAMIANI, G., FERRETTI, L., GOGNONI, G., SGARAMELLA, V. Restriction fragment length polymorphism analysis of the  $\kappa$ -casein locus in cattle. *Anim. Genet.*, 21: 107-114, 1990.
- MEDRANO, J.F. & AGUILAR-CORDOVA, E.. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Bio-Technology*, 8: 144 – 146.1990.
- MIRANDA, G.; ANGLADE, P.; MAHÉ, M. F.; ERHARDT, G.. Biochemical characterization of the bovine genetic  $\kappa$ -casein C and E variants. *Anim. Genet.*, 24: 27-31.1993.
- OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: Na alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39: 225:235.
- SCHILD, T.A.; WAGNER, V.; GELDERMANN, H. Variants within the 5'-flanking regions of bovine milk protein genes: I.  $\kappa$ -casein-encoding gene. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 116 - 120.1994.
- ZADWORNÝ, D. & KUHNLEIN, U. . The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 631-634.1990.