

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HIGH RESOLUTION MELTING PARA DETECÇÃO DE UM SNP NO GENE DA CALMODULINA EM GALINHAS****Raíra C. Kowacic<sup>1</sup>, Igor R. Savoldi<sup>2</sup>, Adriana M. G. Ibelli<sup>3</sup>, Ediane Paludo<sup>4</sup>,  
Jane de O. Peixoto<sup>5</sup> e Mônica C. Ledur<sup>5</sup>**<sup>1</sup>*Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPq/PIBIC, raira\_22@hotmail.com*<sup>2</sup>*Universidade do Contestado, Bolsista CNPq/PIBIC*<sup>3</sup>*Analista da Embrapa Suínos e Aves*<sup>4</sup>*Doutoranda da Universidade do Estado de Santa Catarina, bolsista CAPES*<sup>6</sup>*Pesquisador(a) da Embrapa Suínos e Aves***Palavras-chave:** genotipagem, temperatura de dissociação, *Gallus gallus*.**INTRODUÇÃO**

“High Resolution Melting” (HRM) é uma técnica baseada na análise de dissociação do DNA, que permite detectar diferentes tipos de polimorfismos, como inserções, deleções e polimorfismo de uma única base (SNP), além de variações epigenéticas. É uma metodologia vantajosa, pois é rápida e não requer o uso de sondas que encarecem o processo. Para sua realização, exige o uso de equipamento de PCR em tempo real com a opção *fast* e corantes fluorescentes saturantes que permitem a detecção da variação de até um único nucleotídeo (1). O gene da Calmodulina2 (*CALM2*) pertence à família das calmodulinas e apresenta função na ligação de canais de cálcio, desempenhando um papel importante nas vias de sinalização, proliferação e progressão do ciclo celular (2). Em muitas espécies, o gene da Calmodulina é estudado devido a sua importância como regulador na concentração de cálcio intracelular em processos biológicos vitais (4). Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica HRM para detecção de um polimorfismo no gene da calmodulina2 em galinhas.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Para a padronização da técnica, foram utilizadas aves da população F2 (TCTC) da Embrapa Suínos e Aves, cujo DNA já havia sido previamente sequenciado em equipamento ABI 3130 (Applied Biosystems). Primeiramente, os *primers* para a região de interesse no gene da Calmodulina2 (NC\_006090.3) contendo o SNP240.C>T foram desenhados utilizando o software *primer-blast* (6) e avaliados quanto à qualidade utilizando o software *Netprimer* (3), produzindo um fragmento de 177 pares de bases. Em seguida, foi realizada uma reação de PCR em tempo real (qPCR) em equipamento QuantStudio6 (*Applied Biosystems*) com volume final de 20 uL, contendo o reagente *MeltDoctor HRM Master Mix* (*Applied Biosystems*) na concentração de 1X, 0,3 µM de cada primer F (5'-AAAGCGAGATGCTGACCCTA-3') e R (5'-CAGGTATGGCCACAAACAAG-3') e 25 ng de DNA por amostra. Para esse primeiro teste, 13 amostras com genótipo conhecido foram utilizadas, sendo que uma amostra de cada genótipo CC, CT e TT foram usadas como controle. Para validar a genotipagem, 39 amostras, além dos três controles previamente genotipados, foram submetidas a uma segunda reação de qPCR utilizando os mesmos parâmetros descritos acima. A fim de otimizar a quantidade de reagentes, foi realizado um terceiro teste com volume final de 15 uL, com nove amostras e três controles previamente genotipados e mantendo as concentrações utilizadas anteriormente. Para isso, os volumes dos reagentes foram ajustados para manter as concentrações. Para todos os testes, a reação de amplificação foi efetuada utilizando-se um ciclo de 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão de 60°C por um minuto. Ao final da ciclagem, foi realizada a etapa de obtenção da curva de *melting* em que as temperaturas variaram de 95°C por 10 segundos e 60°C por um minuto, com incremento de rampa a 1,6°C/segundo. Para a obtenção dos genótipos, foi realizada a análise de discriminação alélica e a avaliação da presença de todos os três genótipos, além da comparação dos genótipos obtidos pela técnica de HRM e pela técnica de sequenciamento de DNA.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise de discriminação alélica utilizando a obtenção das curvas de *melting* foi introduzida em 1997 e desde então tem sido uma alternativa na detecção de polimorfismos (5), não requerendo a utilização de sondas ou de processamento pós-PCR, como ocorre na técnica de PCR-RFLP. Desta maneira, torna-se uma técnica prática e viável para a genotipagem de grandes populações de animais. Neste estudo, foi possível observar a amplificação das amostras entre os ciclos de amplificação (CTs) 15 a 22, assim como, apenas um pico na curva de dissociação, indicando a especificidade do par de *primers* utilizado (Figura 1). No primeiro teste, utilizando as recomendações do fabricante com 20 uL de volume final, foi possível discriminar os três genótipos, ocorrendo a concordância genotípica com as amostras sequenciadas previamente. Analisando as outras 39 amostras, os três genótipos foram observados, havendo concordância em 100% das amostras com os genótipos obtidos no sequenciamento. Por fim, no terceiro teste, em que a reação final foi otimizada para 15 uL, as nove amostras analisadas tiveram seus genótipos corretamente discriminados (Figura 2), sendo possível utilizar um volume menor que o recomendado pelo fabricante, economizando os reagentes em cada reação e reduzindo os custos por genotipagem, permitindo sua utilização em um maior número de animais. Além da alta especificidade,

esse método de genotipagem também é mais rápido que outros como PCR-RFLP, *taqman*, ou sequenciamento de DNA.

### CONCLUSÃO

Foi possível efetuar a discriminação dos três genótipos possíveis do SNP240.C>T do gene da Calmodulina2 utilizando a técnica de *High Resolution Melting*. Dessa forma, este ensaio está validado para genotipagem desse gene em galinhas.

### REFERÊNCIAS

1. CORBETT RESEARCH. **HRM – High Resolution Melt Assay Design and Analysis**. Disponível em: <http://www.gene-quantification.de/hrm-protocol-cls.pdf>, 2006. Acesso em 25 de agosto de 2015.
2. GENECARDS. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CALM2>. Acesso em 23 de agosto de 2015.
3. NETPRIMER. Disponível em: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer>. Acesso em 15 de abril de 2015
4. SALDANHA, C. Calmodulina e ATP-ase do cálcio. **Actas Bioq.**, v.1, p. 15-25, 1989.
5. WITWER, C. T.; REED, G. H.; GUNDRY, C. N.; VANDERSTEEN, J. G.; PRYOR, R. J. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Clin Chem**, v. 49, p.853-60, 2003.
6. YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, 13:134, 2012

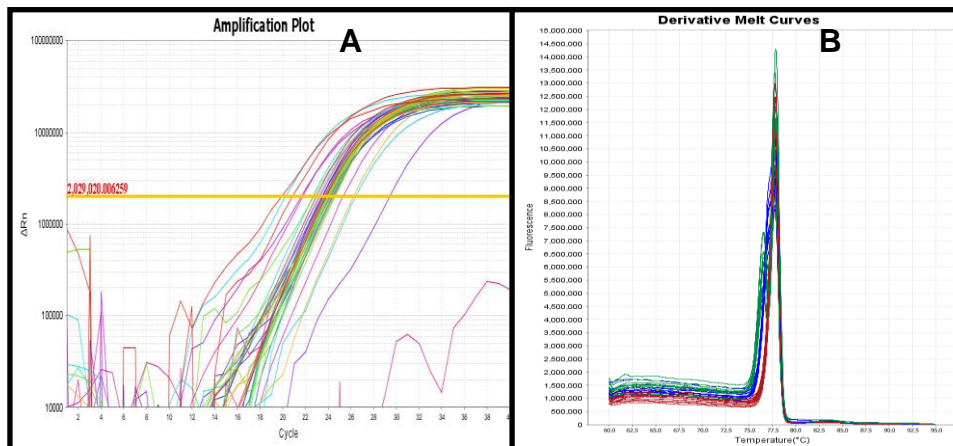


Figura 1. Curva de amplificação das amostras (A) e curva de *melting* para visualização da especificidade do fragmento do gene da calmodulina2 amplificado (B).

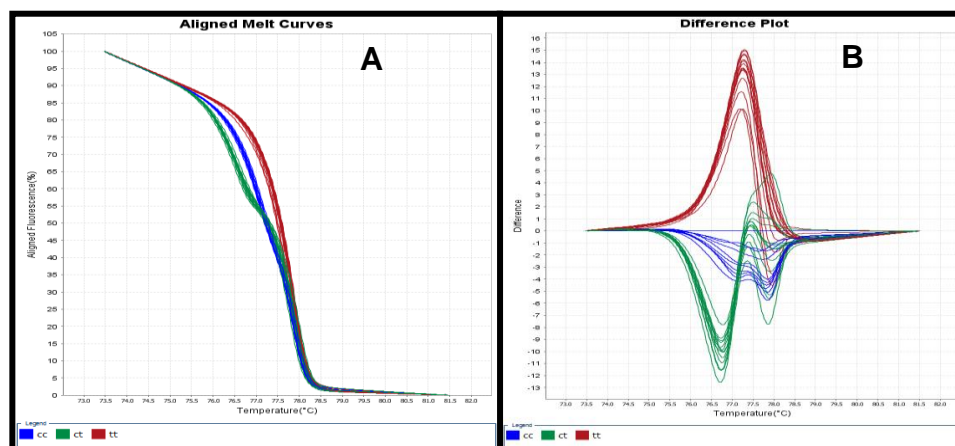


Figura 2. Visualização da discriminação alélica utilizando a análise de curva de *melting* alinhada (A) e do gráfico de diferenciação dos genótipos (B).