



Novo método, simples e econômico, para detecção do polimorfismo K232A no gene DGAT1 baseado em tetra-primer ARMS

Raphael Steinberg da Silva^{1a}, Latife Pereira¹, Gustavo Augusto Lacorte¹, Marco Antônio Machado², Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto², Rui da Silva Verneque², Maria Raquel Santos Carvalho¹

^{1a} Aluno de iniciação científica – UFMG. Bolsista da FAPEMIG. e-mail: raphaelss@ufmg.br

¹ Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. e-mail: mraquel@icb.ufmg.br

² Embrapa Gado de Leite/ Juiz de Fora. e-mail: gaby@cnpqi.embrapa.com.br

Resumo: Recentemente, tem sido encontrada associação entre o polimorfismo K232A no gene DGAT1 com a variação em parâmetros da produção de leite. O método de detecção desse polimorfismo, baseado em PCR-RFLP, é caro e trabalhoso. Portanto, aqui descrevemos um novo método, rápido e barato, baseado em tetra-primer ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system-PCR*), para a detecção do polimorfismo neste gene. Para testar a sensibilidade e especificidade do método, comparamos, em sistema de duplo-cego, os resultados obtidos para uma amostra de 80 animais testados por PCR-RFLP e pelo método aqui descrito. Observou-se 100% de concordância dos resultados (100% de sensibilidade e 100% de especificidade). O desenvolvimento deste método representa uma contribuição importante para a redução dos custos na seleção assistida por marcadores.

Palavras-chave: seleção assistida por marcadores, DGAT1, tetra-primer ARMS, Guzerá, melhoramento genético

New, simple, and inexpensive method for the detection of polymorphism K232A in the gene DGAT1 based on tetra-primer ARMS

Abstract: Recently, association has been shown between the polymorphism K232A in the DGAT1 and parameters of milk production. The method of detection of this polymorphism, based on PCR-RFLP, is expensive and laborious. Therefore, here we developed one method, quicker and inexpensive for the detection of polymorphism in the DGAT1 based on tetra-primer ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system-PCR*). In order to ascertain sensitivity and specificity of the method, we compared in a double-blind system, the results obtained for a sample of 80 animals tested by PCR-RFLP and tetra primer ARMS-PCR. All the results were concordant, suggesting 100% sensitivity and specificity for the method described here. The development of this method is a major contribution to the reduction of the costs in the marker assisted selection.

Keywords: marker assisted selection, DGAT1, tetra-primer ARMS, Guzerat, animal breeding

Introdução

O gene DGAT1 codifica a enzima microsossomal diacilglicerol-O-aciltransferase (EC 2.3.1.20), que catalisa a etapa limitante da síntese de triglicerídeos. Um QTL (*quantitative trait locus*) foi mapeado e subsequentemente clonado no cromossomo BTA14, influenciando traços da produção leiteira em *Bos taurus*. Um polimorfismo no gene DGAT1(K232A) é o responsável pela maior fração de variância alocada a este QTL (Grisart e col., 2002). Outras evidências da importância deste gene vêm do estudo de camundongos *knockout* (DGAT1^{-/-}), que não produziram leite (Smith e cols., 2000). O alelo K está associado ao aumento do teor de gordura no leite, inclusive aumento na quantidade de gordura saturada, redução da quantidade de proteína, aumento na porcentagem de proteína e redução da produção total de leite. O alelo A está associado com aumento da produção de leite e da proteína total e com redução da quantidade de gordura, inclusive de gordura saturada, e da porcentagem de proteína (Schennink e cols., 2007). Outros estudos têm associado o polimorfismo DGAT1 K232A ao marmoreio da carne. Na raça German Holstein o alelo K está correlacionado à maior deposição de gordura intramuscular e consequentemente, maior marmoreio da carne (Thaller e cols., 2003).

O polimorfismo DGAT1 K232A cria sítios de corte para endonucleases de restrição, permitindo a genotipagem por PCR-RFLP com a enzima *CfrI* (Grisart e cols., 2002). O alto custo da enzima *CfrI* eleva o valor do teste, dificultando a utilização desse marcador em estudos populacionais e em seleção assistida por marcadores (MAS). Outro problema é a baixa eficiência dessa endonuclease, produtora de digestões parciais que dificultam a leitura dos resultados e obrigam repetição de testes. Além disso, a técnica de PCR-RFLP é demorada e trabalhosa. Outras técnicas descritas para genotipagem desse

SP
P. 137
6579
6579

polimorfismo são baseadas em discriminação alélica por TaqMan® realizada em PCR em tempo real e análise de ligação de oligonucleotídeos (OLA), ambas de custo operacional mais alto.

Com o objetivo de descrever uma metodologia de genotipagem rápida e barata, apresentamos neste estudo um método alternativo para a detecção do polimorfismo K232A DGAT1, baseado em tetra-primer ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system-PCR*).

Material e Métodos

O tetra-primer ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system-PCR*) é de um sistema de PCR alelo específica, onde produtos gerados pelos dois alelos são amplificados simultaneamente e diferenciados pelo seu tamanho através de eletroforese (Ye e cols., 2001). Com base nas seqüências depositadas no Genbank (AJ318490) para DGAT1, foram desenhados *primers*, que permitiram a construção de sistema de amplificação alelo específico apresentado na Figura 1. Os *primers* desenhados foram: DGAT-Ala-For: 5'-tcaacctctgtgccgagag-3'; DGAT-Ala-Rev: 5'-agctccccgtggccgc-3'; DGAT-Lis-For: 5'-tcgtagctttggcaggaagaa-3'; DGAT-Lis-Rev: 5'-acctggagctgggtga gaa-3'.

Para detecção do polimorfismo K232A por tetra-primer ARMS-PCR, a reação de PCR foi otimizada usando-se um volume final de 25 µL com 10 mM Tris, pH 8,4, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,75 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 8% DMSO, 1U Taq DNA polimerase, 100 ng de DNA genômico, 0,2 µM dos *primers* DGAT1-Ala-For e DGAT1-Lis-Rev e 0,8 µM dos *primers* DGAT1-Ala-Rev e DGAT1-Lis-For. O programa de amplificação usou 5' de desnaturação inicial a 94°, 25 ciclos de amplificação com 94°C por 30 sec, 65°C por 30 sec e 72°C por 30 sec, e 5' de extensão final a 72°. A separação dos produtos de amplificação para genotipagem foi feita por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (Figura 2) ou poliacrilamida 8% impregnado com prata. A identidade das bandas obtidas foram confirmadas por sequenciamento.

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade do método aqui descrito, comparamos, em sistema de duplo-cego, os resultados obtidos para uma amostra de 80 animais, cujos DNAs foram obtidos do bando de DNA da Embrapa - Gado de Leite (47 da raça taurina Holandesa e 33 da raça zebuína Guzerá) testados simultaneamente por PCR-RFLP utilizando *CfrI* e por tetra-primer ARMS-PCR.

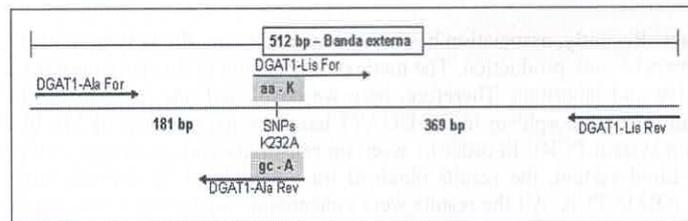


Figura 1 Esquema de amplificação para detecção dos polimorfismo K232A no gene DGAT1 por tetra-primer ARMS-PCR.

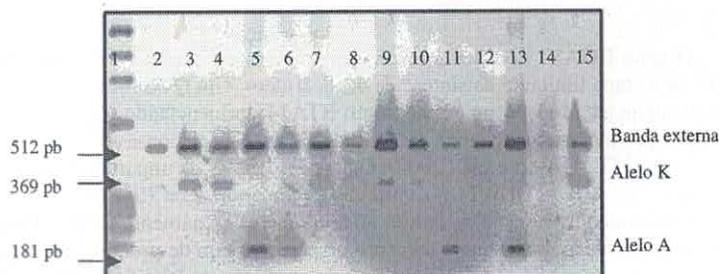


Figura 2 Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. A canaleta 1 contém marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), nas canaletas 2 e 13, animais KA, nas canaletas 5, 6, 11, animais AA e nas demais canaletas, animais com o genótipo KK.

Resultados e Discussão

A amplificação por tetra-primer ARMS-PCR produziu três bandas (Figura 2): uma banda de 512 pb produzida pelos *primers* externos, que funciona como um controle interno de amplificação, um fragmento de 369 pb (alelo da lisina) e um fragmento de 181 pb (alelo da alanina). Todos os resultados foram concordantes para os 160 alelos testados por PCR-RFLP digeridos com *CfrI* e por tetra-primer

ARMS-PCR, sugerindo que o método desenvolvido apresenta sensibilidade e especificidade de 100%, quando comparado ao teste padrão ouro (restrição com *CfrI*). A análise das seqüências obtidas para cada uma das bandas alelo específicas, com o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), confirmou a identidade das bandas.

Tem sido sugerido que o alelo contendo alanina na posição 232 da enzima está associado a um maior volume de leite e também a um leite mais saudável, o que significa, com mais proteínas e menor teor de gordura, especialmente de gorduras saturadas. Altas freqüências do alelo vantajoso têm sido relatadas por muitos estudos em *Bos taurus*. No entanto, freqüências mais baixas deste alelo foram encontradas em *Bos indicus*: 4% em Gir e 2,5% em Sindi Vermelho, e nulo em Nelore e Guzerá (Lacorte e cols., 2006). De acordo com os nossos últimos resultados, com base em amostras maiores, o alelo para alanina deste polimorfismo é encontrado nas freqüências de aproximadamente 0,1% na raça Nelore e 2% na raça Guzerá (manuscrito em preparação). Portanto, é necessário testar um grande número de indivíduos, a fim de identificar aqueles que sejam portadores do alelo vantajoso, para que sejam usados em programas de seleção assistida por marcadores. Por isso, a aplicação de um teste de baixo custo é vital para identificação destes animais em rebanhos onde a freqüência de tal alelo vantajoso é muito baixa.

Conclusões

Os custos do processo de genotipagem descrito aqui são significativamente reduzidos pela utilização do tetra-primer ARMS-PCR. Além disso, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, facilidade e custo eficaz, este novo método é adequado para a utilização na genotipagem do polimorfismo K232A DGAT1 em grandes amostras. Com intuito de reduzir ainda mais os custos, sistemas multiplex devem ser priorizados para reunir, em uma única reação de PCR, o diagnóstico para diversos marcadores já descritos na literatura com efeito considerável sobre os traços de importância econômica da produção animal.

Literatura citada

- GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; KARIM, K.; FORD, C.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* v.12, p.222-231, 2002.
- LACORTE, G.A.; MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L.; CAMPOS, A.L.; MACIEL, R.P.; VERNEQUE, R.S.; TEODORO, R.L.; PEIXOTO, M.G.C.D.; CARVALHO, M.R.S.; AND FONSECA, C.G. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genet. Mol. Res.* v.3, p.475-482, 2006.
- SMITH, S.J.; CASES, S.; JENSEN, D.R.; CHEN H.C.; et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking DGAT. *Nat. Genet.*, v.25, p.87-90, 2000.
- SCHENNINK, A.; STOOP, W. M.; VISKER, M. H. P. W.; HECK, J. M. L. et al. DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Animal Genetics*, v.38, p.467-473, 2007.
- THALLER, G.; KUHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G. et al. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, v.34, p.354-357, 2003.
- YE, S., DHILLON S., KE X., et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, v.29, p.88-96, 2001.