

## Identificação de SNP em região alvo para modificações epigenéticas no gene *CAST* em bovinos

Vanessa Candiotti Buzatto<sup>1</sup>; Marina Ibelli Pareira Rocha<sup>2</sup>; Simone Cristina Méo Niciura<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluna de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, vcbuzatto@hotmail.com;

<sup>2</sup>Aluna de mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP;

<sup>3</sup>Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

O gene da calpastatina (*CAST*) influencia a maciez da carne por controlar a intensidade da degradação de proteínas miofibrilares no período pós-mortem. A  $\mu$ -calpaína é a principal enzima responsável pelo amaciamento do músculo esquelético. De maneira oposta, a calpastatina atua como inibidor endógeno das calpaínas. O gene *CAST* pode sofrer alterações na expressão, influenciadas por modificações epigenéticas. Alterações epigenéticas são caracterizadas como alterações na expressão gênica, em que se observam diferentes consequências fenotípicas, sem haver qualquer mudança na sequência de bases do DNA. Nosso estudo visa encontrar polimorfismos gênicos, do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), resultante da alteração de um único par de bases no genoma, em regiões alvo de modificações epigenéticas no gene *CAST* (GeneID: 281039). Dezoito indivíduos com diferentes genótipos para o SNP A>G no éxon 30/3'UTR do gene *CAST* foram selecionados para a extração do DNA de pele, músculo ou fígado. O DNA foi extraído com solvente orgânico e avaliado no espectrofotômetro NanoDrop, modelo ND-1000, quanto à quantidade e à qualidade, pela razão de absorbâncias 260/280, a qual indica contaminação do DNA por proteína. Foram amplificados, por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 3 fragmentos do gene *CAST*: de 562, 595 e 600 pares de bases, no entanto, somente a amplificação do fragmento CAST600 (3.686-4.285 bp; região rica em sítios de ligação de fatores de transcrição e sítios alvo de miRNA) apresentou resultados satisfatórios. Fizemos PCR dos primers 5'-GTCCAACGGCAGAGTCATCT-3' e 5'-TGGTAGTGATAGTCGCACAAGA-3'. Para a reação de sequenciamento, em primeiro lugar precisamos purificar os produtos de PCR das reações que apresentaram banca única e forte após eletroforese em gel de agarose. Para isso, a cada 5  $\mu$ L de produto de PCR adicionamos 2  $\mu$ L de Exo - SAP (enzima purificadora, que remove primers e dNTPs) e incubamos a 57°C por 30 min e a 80°C por 30 min. Conseguimos bons resultados no sequenciamento capilar (ABI 3100 Avant) para oito amostras do fragmento CAST600. Os eletroferogramas gerados foram submetidos ao programa de *base calling* Phred, que reconhece dados de cromatogramas e identifica a sequência de DNA gerada, atribuindo um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Em seguida, as sequências foram submetidas ao programa de montagem Phrap (*Phragment Assembly Program*), no qual são agrupadas e organizadas em *contigs*. A visualização das sequências geradas foi realizada no programa Consed, no qual a presença de 2 picos no eletroferograma foi interpretada como um SNP. Assim, identificamos um polimorfismo SNP C>T, na posição 3.906 bp do gene *CAST* bovino, ainda não descrito na literatura.

**Apoio financeiro:** CNPq, FAPESP.

**Área:** Biotecnologia