

# **ANÁLISE GENÔMICA DO MICROSSATÉLITE *BYM-1* COM O EMPREGO DO PAINEL DE CÉLULAS SOMÁTICAS HÍBRIDAS IRRADIADAS DE BOVINO/HAMSTER.** Samir Moura Kadri, Mônica Regina Vendrame Amarante, James E. Womack. - Zootecnia – Inter-áreas - Curso de Zootecnia - Faculdade de Zootecnia - Campus de Dracena.

Marcadores moleculares são seqüências específicas de DNA que podem ser analisadas, identificadas e mapeadas. O mapeamento feito com o emprego de painéis híbridos irradiados (*Whole Genome Radiation Hybrid*, WG-RH) comprovou ser um método eficiente para a construção de mapas ordenados e detalhados e, além disso, contribui para o entendimento da organização do genoma e dos cromossomos (GAUTIER; HAYES; EGGEN, 2003). O mapeamento WG-RH apresenta duas grandes vantagens sobre o mapeamento físico e de ligação. Aumentando-se a dose de radiação é possível melhorar a resolução do mapa e, além disso, os marcadores não precisam ser polimórficos para serem incluídos no mapa, o que é uma exigência para a montagem de mapas de ligação. Essa tecnologia foi originalmente descrita por Goss & Harris (1975). Esses autores submeteram uma célula humana diplóide a uma alta dose de raios-X e fragmentaram os cromossomos que foram resgatados através de fusão com células recipientes de roedor. Walter *et al.* (1994) empregaram fibroblastos diplóides de humano (contendo o genoma total) irradiados com 3.000 rads e fusionados com células de hamster A23, deficientes em timidina kinase. As linhagens de células híbridas irradiadas WG-RH (whole genome radiation hybrid cells) foram colocadas em meio HAT e submetidas à seleção. Esses experimentos basearam-se no princípio de que a retenção de fragmentos de cromossomos humanos é não-seletiva, permitindo uma amostragem por igual de todas as regiões do cromossomo. Essa tecnologia foi empregada para a construção de painéis híbridos irradiados de diferentes espécies. O painel WG-RH, empregado nesse estudo, é formado por fibroblastos de bovino que foram irradiados por 5000 rad e sofreram quebras e foram posteriormente fusionados com uma linhagem de células de hamster (WOMACK *et al.*, 1997). O método WG-RH baseia-se na análise das quebras cromossômicas produzidas após exposição a raios-X e a distância entre marcadores é medida pela freqüência de quebras, o que também permite determinar sua ordem no cromossomo. O centiray ( $cR_{5000rad}$ ) é a unidade de distância no mapa RH do presente estudo. Os microssatélites são constituídos por seqüências repetitivas e polimórficas e embora não possam ser utilizados para estudos comparativos, pois não são suficientemente conservados para reconhecer a homologia entre locos nas diferentes ordens de mamíferos (O'BRIEN *et al.*, 1993), têm sido muito utilizados para saturar mapas genômicos, melhorando a resolução de mapas de ligação. Assim, um mapa saturado possibilitaria a localização e identificação de seqüências de DNA codificadoras, bem como de seqüências associadas a QTLs (quantitative trait loci) (MA *et al.*, 1996; GROSSE, W.M. *et al.*, 2000). Este estudo tem por objetivo realizar a análise genômica do microssatélite *BYM-1* com o emprego do painel WG-RH. Para tanto, foram realizadas reações de PCR (Reação de Polimerização em Cadeia). As amplificações foram realizadas em reações com 10 µl, 10 mM Tris-HCl 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3, 100 mM de cada dNTP, 100 ng de DNA genômico proveniente das 90 linhagens do painel WG-RH e 0,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As reações de PCR compreenderam 40 ciclos, precedidos por 95°C durante 5 minutos. Cada ciclo constituiu-se por 30 segundos a 95°C (temperatura de desnaturação), 40 segundos para a temperatura de anelamento, de 63°C e 30 segundos a 72°C (temperatura de síntese). Após os testes com o par de "primers" foi realizada a análise com o emprego das 90 linhagens que compõem o painel WG-RH. As reações com o DNA das linhagens, empregando o par de "primers" de *BYM-1* foram realizadas uma vez e ainda será realizada mais uma análise para corroborar os resultados obtidos. Pode haver a necessidade de se realizar uma terceira análise para solucionar resultados ambíguos. Os produtos da reação foram submetidos a corrida eletroforética, feita em gel de agarose a 2%, contendo Brometo de Etídeo (SAMBROOK; FRITSH; MANIATIS, 1989). Nas fotografias obteve-se bandas de amplificação de tamanhos diferentes para os controles bovino e hamster, o que possibilitou a identificação das linhagens WG-RH que apresentaram o segmento de DNA bovino contendo o microssatélite *BYM-1*. As amostras contendo DNA controle de hamster não amplificaram ou ainda amplificaram bandas de tamanho diferente

da obtida para o DNA controle de bovino, que foi de 255 pares de base (pb). Deste modo, foi possível identificar as linhagens híbridas irradiadas que apresentaram banda de amplificação da região do DNA bovino que contém esse microssatélite. As linhagens do painel WG-RH que apresentaram banda de amplificação de 255 pb foram: #4, #6, #27, #28, #31, #41, #46, #47, #49, #54, #60, #67, #70, #83, #84, #86, #93, #94 e #98.

**Bolsa:** FAPESP - Processo N°04/15641-2