

OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE DA PROTAMINA DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes¹; BASSI, Gabriela²; GUTIERREZ, Harold Julian Perez³; SANTOS Jr., Alceu Gonçalves⁴; MOREIRA, Carla G. Ávila⁵; MOREIRA, Heden Luiz Marques³

¹Universidade Federal de Pelotas- e-mail: nunes.mdnunes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- e-mail: gabi_zootec@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas- e-mail: hajupegu2005@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- e-mail: alceugsjr@gmail.com

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul - e-mail: Carlafarma@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – e-mail: heden.luiz@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As protaminas são proteínas encontradas no sêmen e são altamente ricas em arginina (45-80% moléculas) o que confere a elas um caráter positivo (AUSIÓ, 1999). A ligação da protamina com o DNA tem como consequência a formação do complexo da cromatina sem cargas, permitindo que as moléculas de DNA sejam condensadas. A protamina é codificada pelo gene PRM1 e sintetizada no citoplasma durante o alongamento das espermátides por polirribossomos solúveis (BALHORW, 2007).

Todo o nível de condensação e organização do DNA ajuda a proteger a cromatina do espermatozóide durante o transporte através no trato reprodutivo masculino e feminino, e também garante a entrega do genoma paternal permitindo o desenvolvimento embrionário para a expressão correta da informação genética (SCHULTE et al, 2009).

De acordo BALHORW (2007) a presença da protamina é necessária para a maturação espermiática adequada e a fertilidade de machos. Além disso, a proporção correta de protaminas é essencial para a manutenção da integridade da cromatina do espermatozóide. Sêmen de ratos com deficiência em protamina apresenta um aumento de danificações no DNA, condensação incompleta da cromatina e outros defeitos que impedem o desenvolvimento embrionário depois do estágio de blastocisto. No sentido de avaliar uma possível relação entre a protamina e as taxas de fertilização em jundiá e considerando que este gene ainda não é conhecido para *Rhamdia quelen* este trabalho teve como objetivo clonar uma região parcial do gene da protamina desta espécie, para que posteriormente a sequência completa do gene possa ser obtida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi obtido de sangue de jundiás provenientes da Estação de Piscicultura do Chasqueiro (UFPEL). Para a extração de DNA para clonagem do gene da protamina foi utilizado o Kit Blood Axygen (Axygen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para checagem da qualidade e quantidade do DNA extraído as amostras foram checadas em gel de agarose 0,7% e corados com Gelgreen (Biotium, USA).

Para obtenção da porção da região codificadora do gene da protamina de jundiá foram utilizados os primers degenerados forward 5'-ACCTGCTCACA GGTGGCTG-3' e reverse 5'-GTGGCAAGAGGNTCTTGAAG-3' para amplificar um fragmento a partir do DNA genômico. Após a amplificação fragmentos (de diferentes amostras) foram excisados do gel e purificados com o Kit Axygen Gel (Axygen, USA). Após a purificação os fragmentos foram checados novamente em gel de agarose corados com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizados em transluminador de luz UV. Após ajustes das concentrações os fragmentos foram sequenciados em triplicata em ambas as direções em um seqüenciador ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer.

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* forward do vetor PJET1.2 e 2 μ L do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 μ L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 μ L de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems). A seqüência consenso foi obtida com o programa Geneious 5.1.7 (DRUMMOND et al, 2010)

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir das amplificações com os primers descritos anteriormente e utilizando o DNA genômico foi obtido um fragmento de aproximadamente 400 pb (Figura 1).

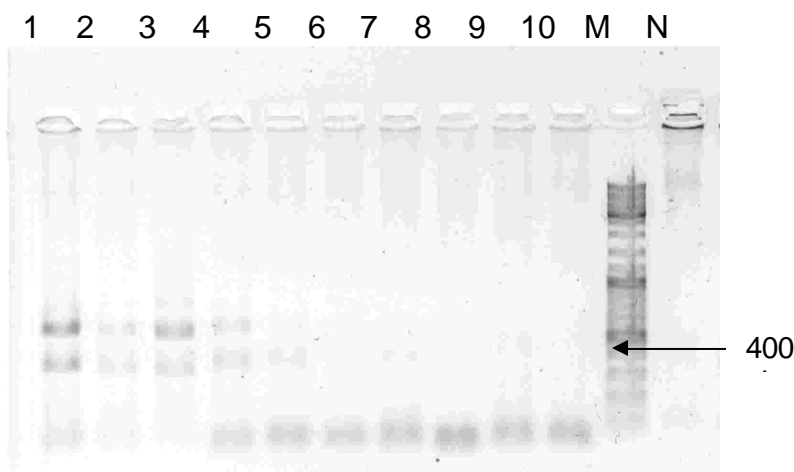


Figura 2 – Otimização da temperatura para os primers degenerados para obtenção do fragmento da protamina de jundiá. Gradiente realizado com temperatura de anelamento de $62^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Amostra 1 - $57,2^{\circ}\text{C}$, amostra 10 temperatura $67,5^{\circ}\text{C}$, M marcador de peso molecular Generuler DNA ladder mix (Fermentas, Canadá) e N controle negativo.

Após o estabelecimento da temperatura ótima de amplificação foram realizadas novas amplificações para purificação dos produtos de PCR (Figura 2). Os fragmentos obtidos foram excisados do gel e purificados com o Kit Axygen Gel extraction (Axygen, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

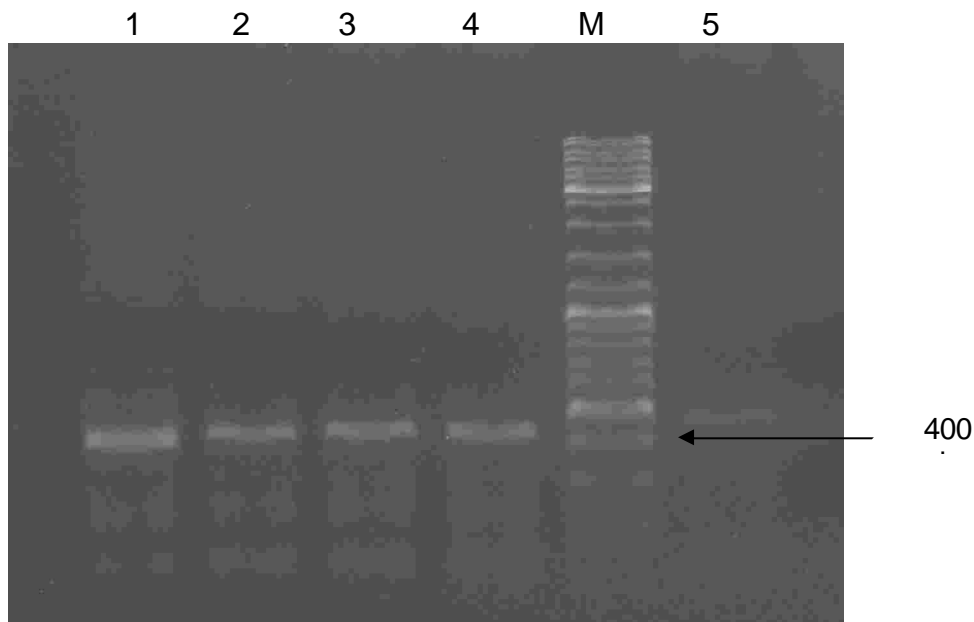


Figura 4 – Amostras de 1 a 4 produto amplificado para protamina obtidos com primers degenerados e temperatura de 61° C. M marcador de peso molecular DNA ladder Mix (Fermentas, Canadá). Amostra 5 não relacionado a este estudo.

O DNA purificado foi utilizado para sequenciamento direto utilizando os primers da amplificação inicial conforme descrito anteriormente.

Inicialmente foi realizada uma análise visual do eletroferograma tomando como base os seqüenciamentos realizados em triplicatas. Posteriormente foi estabelecida a sequência consenso contendo 405 pb. Ambos os procedimentos foram realizados utilizando o programa Geneious 3.5.6 (Biomatters, 2010). Para confirmação do relacionamento da sequência obtida com outras de protamina foi realizado um BLAST no NCBI, tendo sido confirmada a sua especificidade. Primers específicos para a sequência no sentido 5' serão desenhados para obtenção da sequência *upstream* do gene através da técnica de *Genome Walking* (RISHI et al., 2004).

4. CONCLUSÕES

Através do procedimento realizado foi possível obter a sequência parcial do gene da protamina de jundiá, a qual será ser utilizada para obter a sequência promotora e regulatória deste gene através da técnica de *Genome Walking*. Isto possibilitará a realização de experimentos futuros de análise de polimorfismo na região regulatória e do relacionamento deste polimorfismo com caracteres de fertilização para esta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSIÓ, J. **Histone H1 and Evolution of Sperm Nuclear Basic Proteins.** The Journal of Biological Chemistry. British Columbia, v. 274, n. 44, p. 31115-31118, 1999.

BALHORN, R. **The protamine family of sperm nuclear proteins.** Genome Biology. Livermore, v.8, n. 9, p. 227.1-227.8, 2007.

DRUMMON, D A.J.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A.; DURAN, C.; FIELD, M. HELED, J.; KEARSE, M.; MARKOWITZ, S.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; STURROCK, S.; THIERER, T.; WILSON, A. (2010) Geneious v5.3, Available from <http://www.geneious.com>

RISHI, A.S.; NELSON, N.D.; GOYAL, A. Genome walking of large fragments: an improved method. Journal of Biotechnology, V. 111, n.1, p. 9-15, 2004.

SCHULTE. R.T et al. **Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics. Ann Arbor, v. 27, n. 1, p. 13-12, 2010.

Fonte de Financiamento: CNPq, CAPES.