

MINISTERO DELLE POLITICHE  
AGRICOLE E FORESTALI

ASSOCIAZIONE NAZIONALE  
ALLEVATORI SPECIE BUFALINA

UNIVERSITÀ FEDERICO II NAPOLI  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA  
DIPARTIMENTO SCIENZE ZOOTECNICHE  
ED ISPEZIONI DEGLI ALIMENTI



# Atti 3º Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo

## 1<sup>st</sup> Buffalo Symposium of Europe and the Americas

12 - 15 Ottobre 2005  
Capaccio - Paestum (SA)



Regione Campania  
Associazione all'Agricoltura e  
all'Attività Produttiva



Farm and Agriculture Organization



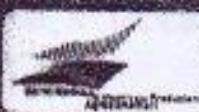
Provincia di Caserta



Provincia di Salerno



CRA  
Consiglio per la Ricerca  
per l'Agroalimentare



ANBIO



Consorzio di Tuzia del  
Formaggio Mozzarella di Bufala Campana



Istituto Zooprofilattico Speciale  
della Regione Lazio e Toscana



Associazione Scientifica Produzione Animale

## MUTATION DETECTION OF MEDITERRANEAN RIVER BUFFALO *DGAT1* GENE

Cosenza, G.; Pauciullo, A.; Gallo, D.; Colimoro, L.; Ramunno, L.

Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli

"Federico II", Italia. E-mail: ramunno@unina.it

### Introduction

Diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) is a microsomal enzyme that catalyses the final and only committed step in formation of triglycerides. Bovine *DGAT1* gene maps to chromosome 14 within the quantitative trait loci (QTL) interval for the fat production in milk (Winter *et al.* 2002). *DGAT1* was proposed to be a functional candidate gene for this trait. The comparison of bovine nucleotide sequences revealed a double not conservative substitution AA→GC (exon 8) responsible of an aa change Lys→Ala in position 232. It has been hypothesized that this mutation increase the percentage of alternative splicing and, therefore, generate an alternative mRNA (smaller than the normal one) which, in turn, might code for an proteic isoform, enough to compromise the activity of the *DGAT1* gene (Grisart *et al.*, 2004). The information obtained from the bovine *DGAT1* gene were applied to study the same gene in Italian Mediterranean river buffalo. The aim of this research was to study the genetic variability to *DGAT1* locus in river buffalo reared in Campania.

### Materials and methods

Genomic DNA was extracted from leukocytes obtained from individual blood samples of 3 Italian Mediterranean river buffalo and reared in the province of Caserta. Primers were designed by OLIGO 5.0 software (National Biosciences Inc., Plymouth, MN), using as templates the sequences of the cow *DGAT1* gene (AJ318490). A 484 bp fragment spanning the 12<sup>th</sup> exon and part of the 15<sup>th</sup> exon of the buffalo *DGAT1* gene was amplified by PCR with the following primers: DGAT 12F (forward: 5'-AGGACATGGACTACTCCC-3') and DGAT 15R (reverse: 5'-GGAGCATGGCTTGTAGA-3'). The 50 μl reaction mix comprised: 100 ng of genomic DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol of each primer, dNTPs each at 400 μM, 2.5 U of *Taq* LA DNA Polymerase (Takara). The amplification programs consisted of an initial cycle at 97°C for 4 min, 63.2°C for 45 s, 72°C for 1 min. Then 35 cycles at 97°C for 1.5 min, 63.2°C for 45 s and 72°C for 1 min with 10 min of extension time in the last cycle. PCR products were analysed directly by electrophoresis in 1.5% TBE agarose gel stained with ethidium bromide. Before sequencing the PCR products were purified using the NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel, Germany). Nucleotide sequencing was carried out according to Sanger *et al.*, 1977. All PCR products were sequenced in both directions. Homology searches, comparison among sequences, and multiple alignments were accomplished by DNASIS-Pro software (Hitachi).

### Results and conclusions

A 484 bp fragment spanning the 12<sup>th</sup> exon and part of the 15<sup>th</sup> exon of the river buffalo *DGAT1* gene was sequenced, both directions for each investigated animal. The comparison of nucleotidic sequences revealed the presence of a polymorphic site, a transition T→C at 69<sup>th</sup> nt of 13<sup>th</sup> exon. This conservative mutation identifies a new silent allele (*DGAT1A1*), because it is responsible of any aa change: GCC<sup>Ala352</sup>→GCT. The next comparison with the homologue bovine sequence revealed, in the cow, the presence of the timine in the same position (69<sup>th</sup> nt of 13<sup>th</sup> exon), so we could suppose that the presence of timine is the wild type condition. Moreover, this substitution was observed in the animal with the highest fat milk production, so it could be used as genetic marker for association studies with qualitative-milk characteristics.

### References

- Grisart *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.101(8), p.2398-403, 2004; Sanger *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.74, p.5463-7, 1977; Winter *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.99, p.9300-5, 2002.

## INDIVIDUAZIONE DI UN ALLELE SILENTE AL LOCUS DEL DGAT NELLA BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA

Cosenza, G.; Pauciullo, A.; Gallo, D.; Colimoro, L.; Ramunno, L.

Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Italia. E-mail: ramunno@unina.it

### Introduzione

L'Acil CoA:diacilglicerol aciltransferasi (*DGAT*) è un enzima microsomiale che catalizza l'ultimo step nella sintesi dei trigliceridi. Nella specie bovina il gene che lo codifica (*DGAT1*) mappa sul cromosoma 14, nella regione che comprende il QTL del grasso del latte (Winter *et al.* 2002). Pertanto il *DGAT1* è stato eletto come il gene candidato funzionale per tale carattere. Fra le mutazioni evidenziate dal confronto delle sequenze, è di rilievo una doppia sostituzione non conservativa AA → GC (esone 8) responsabile del cambiamento aa Lys → Ala in posizione 232. È stato ipotizzato che tali sostituzioni, possano incrementare la percentuale di splicing alternativi e quindi generare popolazioni di mRNA di ridotte dimensioni, che potrebbero codificare per forme proteiche in grado di compromettere l'attività del gene stesso (Grisart *et al.*, 2004). Le informazioni ottenute dall'analisi del gene *DGAT1* nella specie bovina sono state sviluppate per l'analisi dello stesso gene nella specie bufalina. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di studiare la variabilità genetica al locus *DGAT1* nella specie bufalina allevata in Campania.

### Materiali e metodi

Il DNA genomico è stato estratto dai campioni individuali di sangue appartenenti a 3 bufali di razza mediterranea italiana, allevati in provincia di Caserta. I primer sono stati disegnati con l'ausilio del software OLIGO 5.0 (National Biosciences Inc., Plymouth) utilizzando come stampo le sequenze del gene bovino (AJ318490). Un frammento di 484 bp comprendente il 12° esone e parte del 13° esone del gene *DGAT1* bufalino è stato amplificato mediante PCR utilizzando i seguenti primer: DGAT 12F (for: 5'-AGGACATGGACTACTCCC-3') and DGAT 15R (rev: 5'-GGAGCATGGCTGTAGA-3'). La reazione, in 50 µl di mix, è stata così composta: 100 ng of DNA genomico, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol of ciascun primer, 400 µM di ciascun dNTPs, 2.5 U of *Taq* LA DNA Polymerase (Takara). Il programma di amplificazione ha previsto un iniziale ciclo a 97°C per 4 min, 63,2°C per 45 s e 72°C per 1 min. Sono seguiti 35 cicli a 97°C per 1,5 min, 63,2°C per 45 s e 72°C per 1 min completati da un ultimo ciclo, in cui il tempo di estensione è stato allungato a 10 min. I prodotti di PCR sono stati controllati su gel di agarosio al 1,5%. Tutti gli ampliconi sono stati purificati impiegando il kit NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel, Germany) e quindi sequenziati in entrambe le direzioni in accordo con Sanger *et al.*, 1977. Il confronto tra le sequenze, la ricerca di omologie e gli allineamenti multipli sono stati effettuati con l'impiego del software DNAsis-Pro (Hitachi).

### Risultati e conclusioni

Sono state sequenziate 484 bp del gene *DGAT1* per ciascuno degli individui in esame. Il confronto delle sequenze relative ai tre campioni bufalini in esame ha messo in evidenza una sostituzione nucleotidica: trattasi di una transizione T → C realizzatesi al 69° nt del 13° esone. Tale mutazione è di tipo conservativa (silente) in quanto non è responsabile di alcun cambiamento aa: GCC<sup>Ala392</sup> → GCT, tuttavia consente di individuare a tale locus un nuovo allele denominato *DGAT1A1*. Il successivo confronto con l'omologa sequenza bovina evidenzia, anche in tale specie, la presenza della timina al 69° nt del 13° esone. Pertanto, si potrebbe ipotizzare che la presenza di timina rappresenti la condizione wild type. La mutazione osservata si è realizzata nell'individuo che si caratterizza per una maggiore presenza di grasso nel latte, e potrebbe essere utilizzata come marcitore genetico per studi di associazioni con le caratteristiche quali-quantitative del latte.

### Bibliografia

Grisart *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.101(8), p.2398-403, 2004; Sanger *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.74, p.5463-7, 1977; Winter *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v.99, p.9300-5, 2002.