



**SOCIETÀ
ITALIANA DI SCIENZA
DELL'ALIMENTAZIONE**

XVI Congresso Nazionale SISA

**Alimentazione:
Problema dell'Umanità
Attualità e prospettive
nel Terzo Millennio**



**Bari, 18-19 ottobre 2007
Villa Romanazzi Carducci**

Utilizzo di marcatori molecolari per la rintracciabilità di prodotti di origine animale
Use of molecular markers for traceability of products of animal origin

Gianfranco Cosenza, Alfredo Pauciullo, Annalisa D'Avino, Letizia Colimoro, Andrea Mancusi,
Davide Nicodemo, Dino Di Bernardino, Luigi Ramunno*

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università
degli Studi di Napoli "Federico II", Portici, Italia

*Corresponding author. Phone: ++39/0812539004; fax: ++39/0817762886; e-mail:
ramunno@unina.it, Via Università 133, 80055 Portici (NA) IT

Sommario. L'obiettivo del presente lavoro è quello di mettere a punto protocolli di analisi quali-quantitative del DNA per la rintracciabilità dei prodotti di origine animale, attraverso l'utilizzo di marcatori specie-specifici. A tal fine, è stato sequenziato il promoter del gene che codifica per l' α -lattoalbumina (LALBA) bovina, bufalina, ovina e caprina, individuata una sequenza SINE (Short INterpersed Element) monomorfa intraspecie e variabile per dimensioni tra le specie ed è stato messo a punto un protocollo basato sulla PCR per la contemporanea identificazione del DNA di tali specie in prodotti di origine animale. È stata, inoltre, condotta un'analisi quantitativa, mediante PCR Real-Time, del DNA suino in miscele carnee. Per questo scopo, è stata impiegata una sonda Taq-man, disegnata sulla sequenza nucleotidica del 17° esone del gene codificante per la caseina α 1 (CSN1S1) suina e sono stati analizzati alcuni prodotti commerciali, confrontando i dati ottenuti con quelli riportati in etichetta. I risultati conseguiti validano tali tecniche quale strumento idoneo per l'individuazione e la quantizzazione di componenti di origine animale negli alimenti.

Summary. Aim of the present study was to set up protocols for quali-quantitative analysis of DNA for the traceability of products of animal origin, by using species-specific markers. For this purpose, the promoter of the gene coding for the cattle, buffalo, sheep and goat alpha-lactoalbumin (LALBA) was sequenced, and a SINE (Short Interspersed Element) sequence was detected which resulted to be monomorphic 'within' the species and variable in size 'among' the species, and a PCR-based protocol was constructed for the simultaneous identification of the DNA of such a species in products of animal origin. Furthermore, a quantitative analysis was conducted by using Real Time PCR of the pig DNA in meat mixtures. For this purpose, a Taq-man probe was used which was designed on the specific nucleotide sequence of the 17th exon of the gene coding for the α 1 casein (CSN1S1) and some commercial products have been analyzed by comparing the resulting data with those reported on the label. The results obtained validate the proposed techniques as suitable tools for detection and quantification of the components of animal origin in foodstuff.

Parole chiave. rintracciabilità, marcatori molecolari, PCR Real-Time

Key words: traceability, molecular markers, PCR Real-Time

Introduzione. Il tema della rintracciabilità dei prodotti di origine animale nasce nel 1992 in seguito allo scandalo BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), che ha visto crescere l'interesse della collettività verso la sicurezza alimentare. L'approvazione del Regolamento CE n.178/2002 rende obbligatoria la rintracciabilità, la cui entrata in vigore si è realizzata il 1/01/2005, e la definisce come "la possibilità di ricostruire e seguire un processo di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza che entra a far parte di un alimento o mangime attraverso tutte le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione".

L'obiettivo della ricerca è la messa a punto di protocolli di analisi quali-quantitative del DNA per una rapida e accurata rintracciabilità dei prodotti di origine animale.

Materiali e Metodi. Il DNA è stato estratto dai leucociti recuperati da campioni individuali di sangue e prodotti carnei commerciali di specie di interesse zootecnico (bovina, bufalina, caprina, ovina e suina). Per l'individuazione di marcatori molecolari specie-specifici finalizzata alla rintracciabilità di latte e carne è stata sequenziata la regione al 5' (circa 1000 bp a monte del 1° esone) del gene che

codifica per l' α lattealbumina (*LALBA*) nella specie bovina, bufalina, caprina ed ovina. Per la messa a punto di un unico protocollo di PCR che consenta la contemporanea identificazione del DNA delle quattro specie di ruminanti in prodotti carnei o miscele di latte e derivati, è stata impiegata la seguente coppia di primer: 5'-GCTCAGGTTTCAGAATCTTGTTT-3' (forward) e 5'-CTCAGAGTAGGCCACAGAAGGT-3' (reverse). I primer sono stati disegnati mediante l'impiego del software DNASIS-Pro (Hitachi) utilizzando quale template le sequenze del promotore del gene *LALBA* ottenute. La reazione di amplificazione in vitro è stata effettuata in 50 μ l di mix che comprendono: 100 ng di DNA genomico, 10 pmol di ciascun primer, 1.25 U di Taq DNA polimerasi (Promega, Madison, WI), 50 mM di KCl, 10mM di Tris HCl (pH 9.0), 0,1% di Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (ciascuno ad una concentrazione di 200 μ M). La corsa elettroforetica è stata realizzata su gel di agarosio al 2,5% in presenza di bromuro di etidio. In tabella 1 sono riportati i parametri termici di amplificazione.

Tabella 1. Parametri termici per l'amplificazione del promotore del gene *LALBA* nelle specie bovina, bufalina, caprina ed ovina

Cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	97° x 2'	61.5° x 45''	72° x 2'30''
30	97° x 45''	61.5° x 45''	72° x 2'30''
1	97° x 45''	61.5° x 45''	72° x 10'

Per la messa a punto di una metodica basata sulla PCR-Real Time per la quantizzazione di DNA suino in prodotti alimentari sono stati disegnati primer specifici per il gene che codifica per la caseina α 1 (*CSN1S1*) suina (EMBL NM_001004029, Alexander *et al.*, 1992), che amplificano un frammento di 103 bp del 17° esone: 5'-CTGGTATTATCCTCCACAAT-3' (forward) e 5'-CCACTGAGGCATAATCTC-3' (reverse). All'interno del frammento delimitato da tali primer si è proceduto al disegno della sonda Taq-man (5'FAM-TGCTCACCCATTATTCACCAAC-TAMRA3') impiegando il software DNASIS-Pro (Hitachi). Il Fluoroforo scelto è la molecola Fam-6 che emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 490 nm ed il quencher è il Tetrametilrodammia. La reazione di amplificazione PCR Real-Time è stata realizzata in 20 μ l di mix comprendenti: 10 pmol di ciascun primer, 2 pmol di Sonda e 12,3 μ l della Premier mix Ex Taq Takara (25 mM di TAPS, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM di 2-mercaptoetanolo, 200 μ M di ciascun dNTPs, 100 μ M di [a-³²P]-dCTP, 0,25 mg/ml di DNA). In tabella 2 sono riportati i parametri termici di amplificazione. Per quantizzare il DNA suino nelle miscele di carni analizzate è stata realizzata una curva standard o di taratura. A tal fine è stata misurata la concentrazione del DNA dei campioni mediante lettura allo spettrofotometro. A partire da una soluzione di 25 ng/ μ l sono state realizzate diluizioni decimali seriali (da 25 ng a 2.5 pg). Le diluizioni sono state amplificate, in triplicato, per mezzo di PCR real-time e per ognuna è stato definito il Ciclo Soglia.

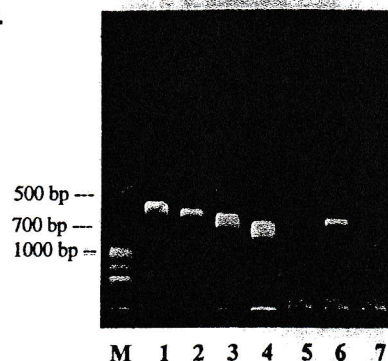
Tabella 2. Parametri termici per la quantizzazione per mezzo di PCR -Real-Time di DNA suino in miscele carnee

Cicli	Step1	Step2
1	95° x 30''	
40	95° x 05''	60° x 35''
1	10° x ∞	

Risultati e discussioni - Analisi qualitativa: dalle analisi delle sequenze ottenute dal sequenziamento del promotore del gene *LALBA* è stato individuato un marcatore, sequenza SINE (nt 531/1181 nella specie bovina, EMBL acc.no. M90645), che dai dati di tipizzazione è risultata monomorfa intraspecie e variabile per dimensioni tra le specie come conseguenza di fenomeni di riarrangiamento del DNA (inversioni, delezioni/inserzioni). Pertanto, l'amplificazione del tratto di DNA che contiene tale marcatore si è rivelato particolarmente idoneo quale strumento di identificazione di DNA specie-specifico in prodotti alimentari. Con l'impiego di un'unica coppia di primer, è stato verificato che ciascuna specie produce uno specifico prodotto di amplificazione, le cui dimensioni sono di 570, 580, 640 e 750 bp, rispettivamente per la specie bovina, bufalina, caprina e ovina (Figura 1). Nello sviluppo del presente lavoro sono state, inoltre, analizzate miscele di DNA bovino/bufalina, caprino/ovino e bovino/bufalino/ovino/caprino, ottenendo pattern elettroforetici le cui

dimensioni delle bande sono riconducibili agli ampliconi prodotti da ciascuna singola amplificazione delle specie esaminate (Figura 1). È stato, inoltre, valutata la sensibilità del metodo per l'identificazione della specie in miscele di DNA. A tal fine è stata realizzata una reazione di PCR su una miscela di DNA bovino, bufalo, capra e pecora con concentrazioni comprese tra 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 100% ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) del DNA di ogni singola specie. È stato osservato che più bassa era la percentuale di DNA di una delle 4 specie nella miscela, più debole era la banda elettroforetica dell'amplicone prodotto con un limite di risoluzione pari allo 0,1% di template iniziale.

Figura 1 Pattern elettroforetici dei prodotti di amplificazione per mezzo di PCR del tratto di DNA che comprende la regione al 5' del gene codificante per la proteina l' α -lattalbumina bovina (pattern 1), bufalina (2), caprina (3) ed ovina (4). Pattern 5: prodotti di amplificazione da DNA bufalino e bovino. Pattern 6: prodotti di amplificazione da DNA ovino e caprino. Pattern 7: prodotti di amplificazione da DNA bovino, bufalino, caprino ed ovino. Marker: 1000bp.



Analisi quantitativa: lo scopo dell'applicazione dell'analisi quantitativa nella presente ricerca è stato la quantizzazione di DNA di una determinata specie animale in prodotti alimentari. Tale analisi si avvale dell'impiego di marcatori molecolari specie-specifici, sui quali è possibile costruire, oltre a primer specifici, sonde molecolari (oligonucleotidiche) (Taq-man) complementari ad una specifica sequenza interna. Tale metodica è stata applicata per la quantizzazione di DNA suino in prodotti alimentari. Per analizzare il genoma suino la scelta è ricaduta su di una sequenza esonica, poiché quest'ultime regioni sono altamente conservate nel genoma. In particolare il target preso in esame è stato il 17° esone del gene codificante per la caseina α_{s1} (*CSN1S1*) suina (EMBL NM_001004029). I primer sono stati disegnati su regioni di non omologia rispetto alle specie bovina, caprina ed ovina. Sono stati, quindi, analizzati alcuni prodotti commerciali. La procedura analitica prevede l'estrazione del DNA, la relativa quantificazione allo spettrofotometro e l'analisi in duplicato mediante PCR Real-time dei campioni. I dati ottenuti sono stati confrontati con i valori riportati sulle etichette di ciascun prodotto (Tabella 3).

Prodotto	Etichetta	Risultato delle analisi effettuate
Wurstel	Prodotto di sola carne di pollo e tacchino	0.06% di DNA Suino
Wurstel	Prodotto di carne equina (45%) e suina (55%)	59 % di DNA Suino
Tortellino	Prodotto di sola carne suina, 41% sul ripieno	56 % di DNA suino

Tabella 3. Valori percentuali di DNA suino ottenuti da analisi per mezzo di PCR Real-time su alcuni prodotti commerciali.

Conclusioni. I risultati del lavoro rappresentano un valido strumento per la individuazione e la quantizzazione di componenti di origine animale negli alimenti. L'elevata sensibilità delle metodiche proposte e la possibilità di analizzare anche prodotti alimentari processati, consente una più accurata e rapida attività ispettive per la rilevazione di adulterazioni fraudolente lungo tutta la filiera alimentare, garantendo al consumatore la massima trasparenza sui prodotti.

Bibliografia: Alexander J., Beattie C.W. (1992). The sequence of porcine α_{s1} -casein cDNA: evidence for protein variants generated by altered RNA splicing. *Animal Genetics*, 23, 283-288; Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74, 5463-7.