

Applicazione di un veloce metodo di estrazione del DNA per l'identificazione di prodotti ittici marini.



I.A.M.C.-CNR di Capo Granitola

Applicazione di un veloce metodo di estrazione del DNA totale finalizzato all'identificazione di prodotti ittici marini.

Biondo G.^A, Cuttitta A.^A, Tagliavia M.^A, Nicosia A.^A, Salamone M.^A, Bennici C. D.^A, Armeri G.M.^A, Torri M.^A, Arculeo M.^C, Mazzola S.^B.

- A- Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.
- B- Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.
- C- Università degli Studi di Palermo, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Palermo, Italia.

Sommario

Applicazione di un veloce metodo di estrazione del DNA totale finalizzato all'identificazione di prodotti ittici marini.....	1
Introduzione.....	3
Materiali e metodi.....	5
Raccolta dei campioni ed estrazione del DNA.....	5
Amplificazione PCR.....	9
Risultati.....	10
Bibliografia.....	11
Ringraziamenti.....	13

Introduzione.

L'identificazione dei prodotti ittici è uno dei temi chiave in materia di sicurezza alimentare.

L'errata etichettatura dei prodotti alimentari e la sostituzione di alcuni ingredienti rappresentano questioni emergenti in termini di qualità e sicurezza alimentare e nutrizionale (Cawthorn et al., 2013; Everstine et al., 2013; Wong & Hanner, 2008).

Molte specie ittiche presentano consistenza delle carni simile, così la certificazione dei prodotti è particolarmente importante quando i pesci vengono sottoposti a procedure che ne modificano la struttura anatomica generale, come la decapitazione, l'affettatura o la sfilettatura (Marko et al., 2004). Inoltre, l'assenza di tratti morfologici, di solito usati per identificare le specie animali, rappresenta un problema e sono quindi necessari metodi di identificazione molecolare. Tra questi, i metodi basati sul DNA sono quelli più frequentemente impiegati (Lockley & Bardsley, 2000).

L'autenticazione e la tracciabilità dei prodotti alimentari, gli studi di tassonomia e di genetica di popolazione, così come l'analisi delle abitudini alimentari degli animali e la selezione delle prede, si basano su analisi genetiche tra cui la metodica molecolare del DNA *barcoding* (Arroyave & Stiasny 2014, Galimberti et al., 2013, Mafra et al., 2008, Nicole et al., 2012 e Rasmussen & Morrissey, 2008), che consiste nell'amplificazione e nel sequenziamento di una specifica regione del gene mitocondriale chiamata COI.

Questa tecnica biomolecolare è utilizzata per fronteggiare la richiesta di determinazione specifica e/o la reale provenienza dei prodotti commercializzati, nonché per smascherare errori di etichettatura e sostituzioni fraudolente, difficile da rilevare soprattutto nei prodotti ittici trasformati (Barbuto et al., 2010, Galimberti et al., 2013 e Filonzi et al., 2010).

L'analisi del DNA estratto dai prodotti ittici lavorati può essere difficoltosa in quanto le procedure di trasformazione (affumicatura, cottura, salagione), possono causare danni chimici e/o la degradazione del DNA (Bauer et al., 2003).

La presenza di inibitori della PCR durante l'estrazione del DNA può compromettere le analisi. Alcuni protocolli prevedono lunghe fasi di incubazione con proteinasi K, detergenti, prodotti chimici caotropici, estrazioni organiche e con resine (Smith et al., 2008); tali componenti sono solitamente impiegati per migliorare la qualità del DNA dai campioni alimentari. Purtroppo, però, la loro presenza può convertirsi in basse rese della reazione a catena della polimerasi (PCR).

Ad oggi sono state proposte procedure veloci per l'estrazione rapida del DNA dai tessuti di pesci (di solito muscoli, pinne, squame o sangue), per diverse applicazioni che prevedono l'utilizzo della tecnica PCR (Li et al., 2013 e Yue & Orban, 2001). Questi protocolli richiedono la purificazione del DNA, in quanto il trasporto di alcuni prodotti chimici impiegati nelle prime fasi può provocare l'inibizione della PCR (Weyant et al., 1990).

Sul mercato sono disponibili differenti *kit* per l'estrazione del DNA da campioni freschi e conservati; l'impiego dei *kit*, aumenta drasticamente il costo dei progetti di caratterizzazione e di genotipizzazione dei campioni da analizzare.

In questo scenario è stato messo a punto un metodo veloce di estrazione del DNA. Esso non prevede nessuna fase di purificazione per i prodotti ittici freschi e trasformati e si presta a qualsiasi analisi che preveda l'utilizzo della tecnica PCR. Il protocollo consente l'amplificazione efficiente del DNA da qualsiasi scarto industriale proveniente dalla lavorazione del pesce, indipendentemente dal metodo di conservazione del campione. Pertanto, questa metodica è particolarmente adatta per il processamento veloce dei campioni e consente di effettuare ricerche per l'autenticazione di pesce mediante analisi del DNA.

Tale metodo consente una rapida applicazione del protocollo rapido e affidabile previsto dal DNA *barcoding* per i pesci, grazie ad esso è possibile utilizzare lisati grezzi per la PCR diretta. Questo metodo, rappresenta una modifica di un protocollo già esistente (Rudbeck & Dissing, 1998); esso è stato migliorato per consentire la dissoluzione efficace di qualsiasi campione di tessuto proveniente sia da adulti che da giovanili, sia freschi che conservati (a -20°C o in etanolo), sia integri che trasformati in prodotti ittici, minimizzando qualsiasi effetto inibitorio sulla PCR.

L'applicazione di questo metodo di estrazione del DNA, combinato al successo e alla robustezza della amplificazione PCR (secondo protocollo *barcode*) ha permesso di ottenere, in tempi brevissimi e con costi minimi, il sequenziamento del DNA.

Materiali e metodi.

Raccolta dei campioni ed estrazione del DNA

I campioni di larve di Pesci Ossei (Fig. 1) sono stati raccolti durante le indagini oceanografiche del CNR condotte sulla nave da ricerca Urania e conservati in etanolo a temperatura ambiente.

Il reperimento dei campioni di Pesci Ossei (Fig. 2), Crostacei Decapodi (Fig. 3) e Molluschi Cefalopodi (Fig. 4) adulti, specie eduli e di *bycatch*, è avvenuto tramite la pesca e i mercati ittici locali; essi sono stati conservati a -20 °C o analizzati immediatamente dopo la raccolta.

I 144 campioni di Actinopterygii, sono rappresentativi di Pesci Ossei distribuiti in 48 specie, 29 generi e 12 ordini. I 24 esemplari di Molluschi Cefalopodi appartenenti alla classe dei Cephalopoda, rientrano in 8 specie, 6 generi, 7 famiglie, 5 ordini.

I 69 campioni appartenenti all'ordine dei Crostacei Decapodi appartengono a 23 specie, 20 generi e 19 famiglie (come riportato in Tab. 1).

	Pesci Ossei	Molluschi Cefalopodi	Crostacei Decapodi
Numero individui	144	24	69
Numero specie	48	8	23
Numero generi	29	6	20
Numero famiglie	30	7	19
Numero ordini	12	5	1

Tabella 1: Tabella riassuntiva dei campioni.

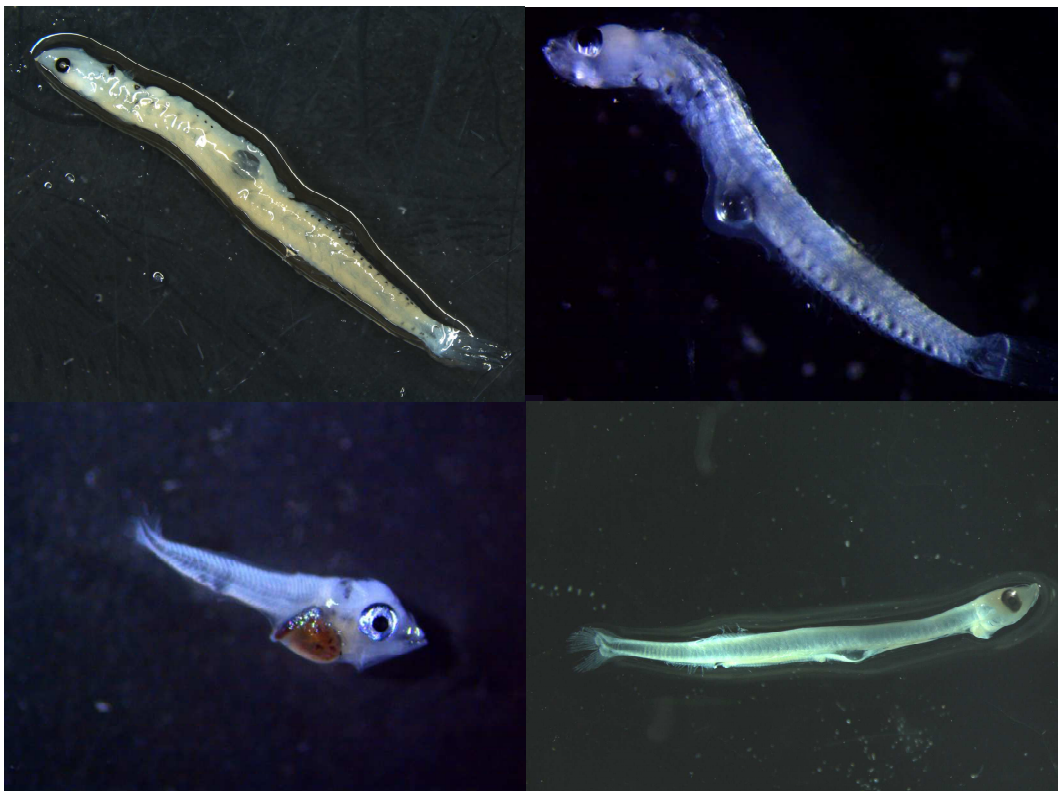


Figura 1: Esempi di larve di Pesci Ossei.



Figura 2: Esempi di Pesci Ossei.



Figura 3: Esempi di Crostacei Decapodi.

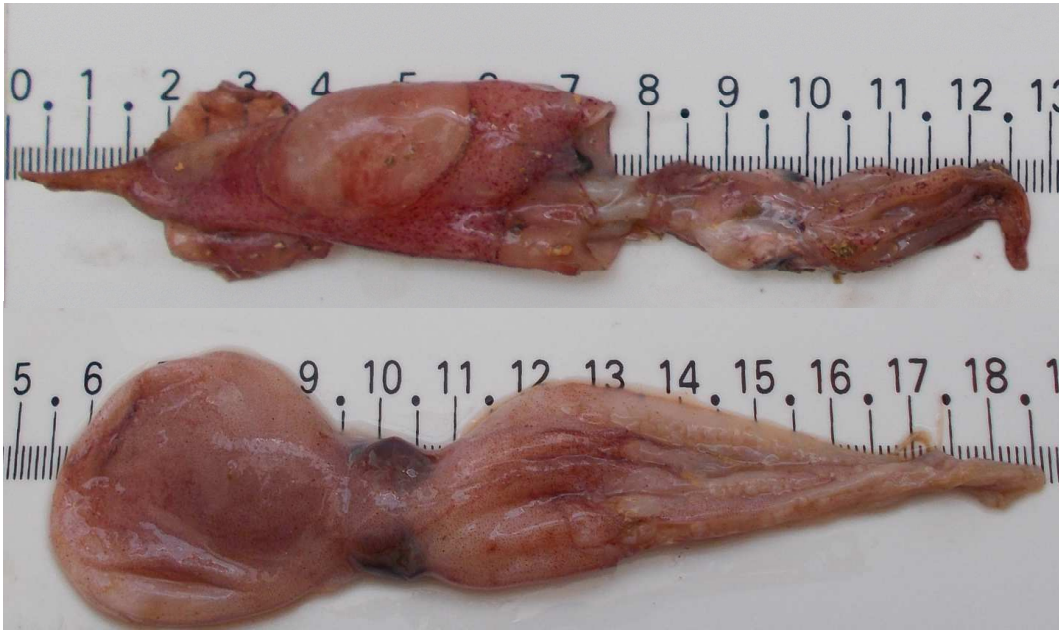


Figura 4: Esempi di Molluschi Cefalopodi.

I campioni sono stati trattati secondo il protocollo riportato in Tagliavia et al., 2016; in particolare frammenti di tessuto di circa 2-20 mg o singole scaglie sono stati incubati in 100 μ l di soluzione di lisi (200 mM KOH, 2 mM Na₂EDTA, 0,2% Triton X-100) a 60° C per 15minuti o fino a quando il campione non apparisse dissolto.

Dopo breve agitazione, a ciascun campione sono stati aggiunti 3 volumi di Tris-HCl 100 mM.

Le larve conservate in etanolo sono state idratate in H₂O bidistillata per 5 minuti a temperatura ambiente prima di effettuare la lisi.

L'omogeneizzazione del campione, come ad esempio il tessuto muscolare, è avvenuta mediante un bisturi o un micro pestello, ha permesso di ridurre il tempo di incubazione a 2-5 min.

Amplificazione PCR.

Per l'amplificazione PCR sono stati utilizzati tra 1 e 5 µl di lisato grezzo come stampo. Le reazioni sono state eseguite in un volume totale di 25 microlitri con 0,3 µl di *Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific)* in un tampone 1X, 0,2 mM dNTP (*Euroclone*), BSA (0,5 mg / mL; New England Biolabs), 0,5µM di ognuno dei *primer* riportati in Tabella 2. Nelle reazioni di amplificazione, per il gene COI nei pesci, gli oligonucleotidi utilizzati come *primer* sono stati quelli disegnati da Ward et al. nel 2005; per i Molluschi Cefalopodi e i Crostacei Decapodi, sono stati utilizzati gli oligonucleotidi disegnati appositamente per gli invertebrati da Folmer et al. nel 1994 (vedi Tab. 2).

Nome <i>primer</i>	Sequenza oligonucleotidica	Bibliografia di riferimento
FishF1	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	Ward et al., 2005
FishR1	5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'	
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al., 1994
HC02198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	

Tabella 2: Oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di amplificazione mediante PCR.

Le condizioni di PCR sono state: denaturazione iniziale a 98° C per 15 secondi, seguiti da 40 cicli di denaturazione a 98° C per 10 secondi, 55 ° C per 10 secondi, 72 ° C per 15 secondi, e 1 minuto di estensione finale a 72° C per pesci e 98° C per 15 secondi, seguiti da 40 cicli di denaturazione a 98 ° C per 10 secondi, 48 °C per 15 secondi, 72 ° C per 20 secondi, e 1 minuto di estensione finale a 72 ° C per invertebrati. Le reazioni sono state eseguite nel termociclatore *Verity (Applied Biosystems)*. Il profilo di reazione è riportato nella tabella di seguito (Tab. 3).

Primer	Profilo di reazione
Per i pesci FishF1/FishR1	<i>Step</i> iniziale 98° C per 15 secondi 40 cicli del seguente profilo 98° C per 10 secondi 55 ° C per 10 secondi 72 ° C per 15 secondi <i>Step</i> finale per consentire l'estensione a 72C° per 1 minuto
Per gli invertebrati LCO1490/ HC02198	<i>Step</i> iniziale 98° C per 15 secondi 40 cicli del seguente profilo 98° C per 10 secondi 48 ° C per 15 secondi 72 ° C per 20 secondi <i>Step</i> finale per consentire l'estensione a 72C° per 1 minuto

Tabella 3 : Profilo di reazione della PCR in termociclatore *Verity* (*Applied Biosystems*).

Risultati.

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% (Fig.5) contenente *Gelred* (Biotium). Tutti i prodotti di PCR sono stati purificati mediante *QIAquick gel and PCR extraction kit* (Quiagen®) ed il DNA così estratto dal prodotto di PCR è stato utilizzato per allestire i campioni da inviare al “servizio di sequenziamento automatizzato” affidato alla MACROGEN® in Olanda al fine di confermare la specificità della reazione di amplificazione PCR.

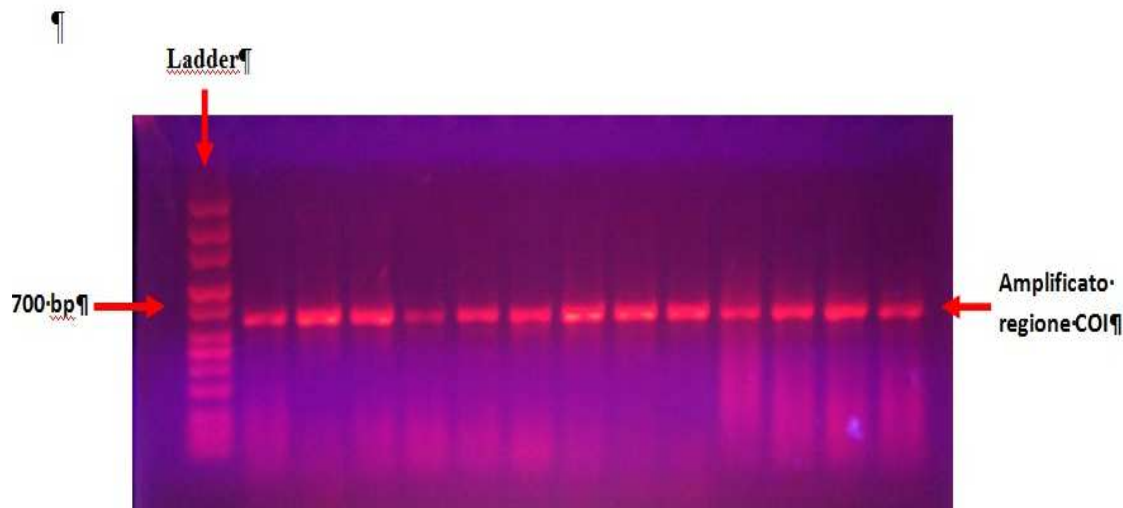


Figura 5: I frammenti, di acido nucleico, visualizzati come bande discrete rappresentano il successo della reazione di PCR.

Bibliografia.

Arroyave, J., & Stiassny, M. L. J. (2014). DNA barcoding reveals novel insights into pterygophagy and prey selection in distichodontid fishes (Characiformes: Distichodontidae). *Ecology and Evolution*, 4(23), 4534–4542.

Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P., et al. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*, 43, 376–381.

Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research Technology*, 217, 1438–2377.

Cawthorn, D. M., Steinman, H. A., & Hoffman, L. C. (2013). A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control*, 32(2), 440–449.

Everstine, K., Spink, J., & Kennedy, S. (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: Common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection*, 76(4), 723–735.

Filonzi, L., Chiesa, S., Vaghi, M., & Nonnis Marzano, F. (2010). Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International*, 43, 1383–1388.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., et Vrijenhoek (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., et al. (2013). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International.*, 50, 55–63.

Lockley, A., & Bardsley, R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 67–77.

Mafra, I., Ferreira, I. M. P. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. O. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665.

Marko, P. B., Lee, S. C., Rice, A. M., Gramling, J. M., Fitzhenry, T. M., McAlister, J. S., et al. (2004). Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*, 430, 309–310.

Nicolé, S., Negrisolo, E., Eccher, G., Mantovani, R., Patarnello, T., Erickson, D. L., et al. (2012). DNA barcoding as a reliable method for the authentication of commercial seafood products. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 387.

Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 280–295.

Smith, P. J., McVeagh, S. M., & Steinke, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smokedfish products. *Journal of Fish Biology*, 72, 464–471.

Tagliavia, M., Nicosia, A., Salamone, M., Biondo, G., Bennici, C. D., Mazzola, S., Cuttitta A. Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification. *Food Chemistry* 203 (2016) 375–378.

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., 2005. Barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 360, 1847–1857.

Weyant, R. S., Edmonds, P., & Swaminathan, B. (1990). Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *Biotechniques*, 9(3), 308–309.

Wong, E. H. K., & Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8), 828–837.

Ringraziamenti.

- Progetto “Nuove Rotte: Blue Economy” Piano Sviluppo di Filiera PO FESR Sicilia 2007/2013 – Obiettivo Operativo 5.1.1, Linea d'intervento . TUTELA E VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI FRESCHI, DI ALLEVAMENTO E TRASFORMATI 5.1.1.2

- Progetto: “Tecnologie e processi per il miglioramento della *shelf-life* dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l'uso di film edibili innovativi a base pectinica” (“PON FILM-EDIBILI”, Cod. PON01_02286 - CUP: B68F12000360007.

- Progetto Bandiera RITMARESP2_WP4_AZ2_UO04_D06. A. Cuttitta.