

Estrazione del gDNA da CARNE (lisi alcalina)



J Food Sci Technol (January–February 2013) 50(1):141–146
DOI 10.1007/s13197-011-0230-6

ORIGINAL ARTICLE



A rapid method for authentication of Buffalo (*Bubalus bubalis*) meat by Alkaline Lysis method of DNA extraction and species specific polymerase chain reaction

P. S. Girish • S. Haunshi • S. Vaithyanathan •
R. Rajitha • C. Ramakrishna

Turk. J. Vet. Anim. Sci.
2007; 31(3): 159-163
© TÜBİTAK

Research Article

Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique*

O. İrfan İLHAK**, Ali ARSLAN

Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Firat University, Elazığ - TURKEY

Received: 21.01.2006

Quando si acquista carne al supermercato o in macelleria di solito non si hanno problemi a capire se la merce è fresca e ben conservata, anche solo osservando attentamente l'aspetto e il colore di ciò che si vuole comperare. Se invece si acquista un macinato, un insaccato o un polpettone la difficoltà nel riconoscere la freschezza e la qualità è maggiore, per non parlare della provenienza delle carni che vengono tritate e amalgamate insieme. In questi casi per identificare la specie a cui appartiene la carne macinata si deve ricorrere al test del DNA.

Con la PCR viene amplificata una parte del citocromo B, un gene mitocondriale: si utilizza un primer forward (5'---CCTCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA---3') comune a tutte le specie carnee mentre come reverse primer viene utilizzato un oligonucleotide specie---specifico (vedi tabella).

No.	Oligo Name	Sequence (5' -> 3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Concentration [pmol/µl]	Vol. for 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Synthesis Scale	Purification
1	CARNE -F	CCTCCCAGCTCCATCAAA CATCTCATCTTGATGAAA (36)	20.3 6	575	52.9	-	529	69.5	10868	44.4 %	0.05 µmol	Salt Free
2	POLLO-R	AAGATACAGATGAAGAAG AATGAGGCG (27)	18.7 4	456	53.8	-	538	61.9	8464	40.7 %	0.05 µmol	Salt Free
3	MUCCA-R	CTAGAAAAGTGTAAAGACC CGTAATATAAG (29)	19.4 8	491	54.8	-	548	61.0	8967	34.5 %	0.05 µmol	Salt Free
4	PIG-R	GCTGATAGTAGATTTGTG ATGACCGTA (27)	15.6 2	426	50.9	-	509	61.9	8369	40.7 %	0.05 µmol	Salt Free

I prodotti della PCR sono quindi di lunghezza tipica della specie a cui appartiene il campione analizzato. Le questioni di autenticità alimentare e di adulterazione sono delle problematiche attuali da quando il cibo è stato portato alla commercializzazione: il cibo adulterato entra spesso nella catena alimentare con danni alla salute delle persone. I metodi comunemente impiegati, per l'estrazione del gDNA da carne allo stato attuale sono: kit commerciali; da fenolo: cloroformio; alcol Isoamilico (PCI). I metodi basati su kit commerciali sono costosi, mentre quelli con PCI sono relativamente poco costosi, ma laboriosi e lunghi.

Il **metodo con lisi alcalina (LA)** permette di estrarre il gDNA da carne e sottoprodotti in modo standardizzato. A parte la riduzione del costo, questo metodo riduce il tempo di estrazione a meno di 30 minuti, è meno faticoso ed evita problemi di contaminazione incrociata. Il metodo simile è stato utilizzato per l'estrazione del gDNA da sangue intero, cellule epiteliali buccali, lo sperma e le macchie forensi. Il metodo di lisi alcalina è stato utilizzato anche per il sessaggio di embrioni di pollo con sangue intero, tessuto embrionale.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni di tessuto muscolare di manzo, capra, pecora, maiale sono stati utilizzati; essi sono stati conservati a $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ fino al momento dell'analisi.

MATERIALE: bilancia; guanti e puntali sterili; bagno termostatico; acqua sterile; provette; alluminio

PROCEDURA

- Circa 500 mg di carne è stata tritata con quattro volumi (4 ml) di NaOH 0,2N;
- Pipettare 5 µl dell'estratto e metterli in una provetta sterile da 2 ml;
- Questi 5 µl sono mescolati con otto volumi, cioè 40 µl di NaOH 0,2N;
- Il mix viene riscaldato a 75°C a bagnomaria per 20 min;
- Si aggiungono otto volumi, quindi 360 µl di 0,04 M Tris HCl (pH 7,75) per la neutralizzazione del pH;
- Caricare 5 microlitri in un gel di agarosio (0,8% W/V) per visualizzare la qualità del DNA estratto.
- Determinare la quantità del gDNA estratto
- 1 microlitro della miscela finale (contenente circa 100 ng gDNA) è stato utilizzato per la PCR.

AMPLIFICAZIONE CON multiplex PCR (mPCR): Identificazione della specie carnea

Con la PCR si utilizza un primer forward (5'---CCTCCCAGCTCCATCAAAACATCTCATCTTGATGAAA---3') comune a tutte le specie carnee mentre come reverse primer viene utilizzato un oligonucleotide specie---specifico. I prodotti della PCR sono quindi di lunghezza tipica della specie a cui appartiene il campione analizzato.

Specie carnea	Primer reverse
capra	5'-CTC GAC AAA TGT GAG TTA CAG AGG GA-3'
pollo	5'-AAG AT A CAG ATG AAG AAG AAT GAG GCG-3'
bovino	5'-CTA GAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT, ATAAG-3'
maiale	5'-GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA-3'
cavallo	5'-CTC AGA TTC ACT CGA CGA GGG TAG TA-3'

PROCEDIMENTO:

MARCATORE GENETICO:		DATA:
REATTIVI x 1 campione:	Totale 25 µl	MIX per 5 campioni:
Buffer 10X	2,5 µl+	
dNTPs	0,25 µl+	
Primer F (carne)	1 µl+	
Primer R (pollo)	0,6 µl+	
Primer R (bovino)	0,6 µl+	
Primer R (maiale)	0,6 µl+	
BSA	0,21 µl+	
Taq polimerasi	0,15 µl=	
DNA	1,5 µl	
VOL. MIX: µl		
H20 (bianco=W) µl;		
Tenendo conto che la [DNA] ~ 10 ng/µl in ciascun campione H20 =(25-mix-1,5 DNA) = µl		
Ovvero: H20 =(25-mix)= µl		
Sigla sulla provetta		
1	Campione ignoto 1	
2	Campione mucca	
3	Campione pollo	
4	Campione maiale	
W	bianco	
Bianco (w)		

E' indispensabile aggiungere per ogni amplificazione un controllo negativo non contenente DNA al fine di escludere eventuali contaminazioni sperimentali. Il programma di PCR utilizzato in genere è così impostato:

	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	94 °C	4'
2	94 °C	30''
3	60 °C	30''
4	72 °C	30''
5	Ripetere 31 volte dal punto 2	
6	72 °C	10'
7	4°C	∞

I prodotti della PCR vengono poi visualizzati su gel di agarosio e si evidenziano le seguenti bande :

- 157 bp (base pairs, coppie di basi) per la carne di capra
- 227 bp per la carne di pollo
- 274 bp per la carne bovina
- 398 bp per la carne di maiale
- 439 bp per la carne di cavallo