

NUOVO PROTOCOLLO BASATO SULL'ANALISI DEGLI SNPs APPLICATO ALLA TRACCIABILITÀ DELLA CARNE BOVINA

Blasi M. (1), Lanza A. (1), Genzini E. (1), Sassano A. (2)

- (1) *L.G.S. Laboratorio di Genetica e Servizi Società Cooperativa - Via Bergamo, 292 Cremona/Potenza (Italy) e-mail lgscr@lgscr.it*
(2) *Parco Scientifico e Tecnologico del Molise – Moliseinnovazione – Via dell'edilizia Potenza (Italy).*

RIASSUNTO - Il Laboratorio di Genetica e Servizi, da 25 anni al servizio del mondo zootecnico italiano, ha sviluppato un protocollo innovativo, basato su una nuovissima classe di marcatori genetici (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms), per l'identificazione dei bovini e per la tracciabilità genetica della carne. Per la definizione del metodo sono stati prelevati due tipologie diverse di materiale biologico da 100 soggetti di razza Podolica: un ciuffetto di peli, durante la fase di allevamento, e un frammento di tessuto muscolare, subito dopo la macellazione. Il confronto tra il DNA estratto è stato, effettuato utilizzando 19 SNPs scelti tra quelli già pubblicati in letteratura. I risultati ottenuti dimostrano l'elevata attendibilità del protocollo, che rispetto a quelli attualmente in uso, risulta essere più veloce, economico e completamente automatizzabile.

PAROLE CHIAVE: Tracciabilità, Carne, DNA, SNPs

INTRODUZIONE

Da alcuni anni i laboratori genetici, in cui si svolgono ricerche su animali di interesse zootecnico, partecipano al progetto della costruzione di mappe genomiche. Il fine della costruzione di tali mappe è di disporre di un numero elevato di marcatori genetici, altamente polimorfi e ben distribuiti sui cromosomi, per identificare, in famiglie informative, i geni che influenzano i caratteri produttivi e riproduttivi degli animali di interesse zootecnico. La disponibilità di un numero così elevato di marcatori fornisce uno strumento estremamente potente, anche, per la precisa identificazione genetica degli animali, per i test di parentela e per la tracciabilità genetica dei prodotti agro-alimentari. Per raggiungere tali obiettivi, sino ad oggi è stato sfruttato il polimorfismo di una particolare classe di marcatori del DNA: i microsatelliti. Il limite dei microsatelliti risiede, però, nell'elevato costo dell'analisi e nella scarsa rapidità d'esecuzione delle analisi stesse. Per tale motivo, nel corso di questi ultimissimi anni, nei laboratori di biologia molecolare animale, si sta studiando una nuovissima classe di marcatori genetici: gli SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Gli SNPs sono mutazioni puntiformi disperse casualmente lungo tutto il genoma e sono i marcatori del DNA più diffusi (uno ogni 500-1000 nucleotidi). Questi marcatori, oltre ad essere i più frequenti, sono quasi sempre biallelici e si prestano ad essere analizzati mediante sistemi completamente automatizzati, detti di high-throughput, che sfruttano il fatto che i due alleli possono essere analizzati e trattati in modo binario (Vignal *et al* 2002). Il presente lavoro è finalizzato a stabilire un nuovo protocollo di identificazione individuale e di tracciabilità della carne bovina mediante l'analisi di 19 SNPs. scelti tra quelli già pubblicati in letteratura (Heaton *et al.* 2002; Plancon *et al.* 2004). Tali marcatori sono stati selezionati considerando le seguenti caratteristiche:

- le frequenze dei due alleli vicine al 50%;
- le frequenze minime di ciascuno dei due genotipi omozigoti uguali al 10%;
- la localizzazione su cromosomi diversi e ben distribuiti lungo il genoma;
- non devono essere in linkage disequilibrium tra di loro;
- devono essere amplificabili in modo efficiente e ripetitivo mediante la Reazione a Catena della Polimerasi (PCR);
- devono essere trasmessi in modo mendeliano

MATERIALI E METODI

Da 100 soggetti appartenenti alla razza Podolica, allevati in aziende della provincia di Potenza e Matera, sono stati prelevati due tipologie diverse di materiale biologico, un ciuffetto di peli, durante la fase di allevamento, e un frammento di tessuto muscolare, subito dopo la macellazione. Dai 200 campioni è stato prelevato il DNA mediante un protocollo basato sull'utilizzo di due tensioattivi (Tween 20 e NP40). L'elenco dei 19 marcatori analizzati, il relativo SNP e le grandezze dei frammenti amplificati sono riportati in tabella 1. L'amplificazione è stata effettuata in un volume di 25µl contenente 100ng di DNA, 1x PCR buffer, 0,75mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 40 µM primers e 0,5 U Taq DNA polimerasi; con il seguente ciclo di amplificazione: denaturazione a 94°C per 30"; annealing a 55°C; extension a 72°C per 1' per 35 cicli; estensione finale di 10' a 72°C. I frammenti di DNA amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 3% contenente etidio bromuro, e visualizzati con transilluminatore a raggi UV.

Per la determinazione del genotipo dei singoli SNP è stata utilizzata la tecnica della estensione di una singola base (ddNTPs single base extension)(tabella 2). In pratica si effettua una minisequenza costituita dal solo nucleotide in cui è presente la mutazione. Il primer utilizzato, oltre ad essere complementare al template deve essere immediatamente adiacente il punto di mutazione. Nella reazione, oltre al template, al primer non marcato e alla DNA polimerasi sono presenti i 4 dideossinucleosidi trifosfato, ognuno dei quali marcato con uno specifico fluorocromo (A-dye terminator marcato con R6G; C-dye terminator marcato con TAMRA, G-dye terminator marcato con R110 e T-dye terminator marcato con ROX). Durante la reazione di sequenziamento il primer si estenderà incorporando un solo ddNTP (complementare alla sequenza del template). La successiva corsa elettroforetica e l'analisi con specifici software consentirà di determinare quale base è presente nel punto di mutazione. Il tracciato elettroforetico presenterà un solo picco nel caso di soggetti omozigoti, viceversa la presenza di due picchi indica che il soggetto è eterozigote per lo SNP analizzato. Il colore del picco identificherà il nucleotide presente: la presenza di un picco verde indica la presenza di Adenina, il colore rosso indica la presenza di Timina, il colore nero indica la presenza di Citosina e infine, il colore blu indica la presenza del nucleotide Guanina (Bernat *et al.* 2002). Per questa analisi è stato utilizzato il kit SnaPshot ddNTP Primer Extension (PE Applied Biosystem). La reazione è stata condotta in un volume totale di 10ul contenente 0,15 pmol/□l di DNA amplificato, 0,15 pmol/□l di primer e 5 □l di SnaPshot Ready ReReaction Mixture. Le reazioni sono state incubate in termociclatore per 25 cicli alle seguenti condizioni: 96°C per 10s, 50° C per 5s e 60°C per 30s. 1 µl di reazione è stato miscelato con 12 µl di formammide e con 1 µl di Genescan 120 LIZ Size Standard e successivamente è stato sottoposto ad elettroforesi capillare sul sequenziatore ABI 3100 Avant Genetic Analyzer e analizzato con il software Genescan Analysis (PE Applied Biosystem). Allo scopo di verificare l'accuratezza dei risultati ottenuti con questo protocollo per la tracciabilità con gli SNPs abbiamo confrontato i risultati con quelli ottenuti con la metodica dei microsatelliti. Sono stati utilizzati 9 microsatelliti (BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227) in una unica PCR. (Blasi *et al.*, 2001). I prodotti di PCR sono stati mescolati con GeneScan 350 ROX come internal size standard prima di caricarli per l'elettroforesi capillare, utilizzando un ABI Prism 3100 DNA Sequencer. La determinazione del genotipo è stata effettuata con i softwares GeneScan e Genotyper.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ottenuti i genotipi dei singoli campioni di DNA, relativi ai 19 SNPs analizzati, si è proceduto al confronto tra il DNA estratto da bulbo pilifero e quello estratto dal tessuto muscolare, prelevato subito dopo la macellazione dell'animale. I due genotipi devono, necessariamente, essere identici, in quanto il patrimonio genetico di un individuo è lo stesso in tutte le sue cellule. Tale confronto è stato effettuato, automaticamente, mediante l'utilizzo di uno specifico software sviluppato nei laboratori LGS in collaborazione con Italservice, la società informatica

dell'Associazione Italiana Allevatori. A titolo di esempio si riporta nella tabella 3 il confronto tra due genotipi identici e di due che invece sono risultati discordanti. Con il protocollo ora descritto, è stato possibile individuare ben 15 incompatibilità tra i genotipi dei bulbi e quelli di tessuto muscolare. Inoltre, il metodo proposto può essere utilizzato per il controllo dei casi di abigeato; di falsa identificazione e di errata parentela. Allo scopo di completare il lavoro, stiamo determinando le frequenze all'allele e genotipiche, nonché la probabilità di esclusione (PE) per tutte le razze italiane da carne.

Tabella 1 – Nome del locus, primers forward/reverse e grandezza del frammento amplificato
Table 1 – Locus name, primers forward/reverse and fragment size (bp)

Locus Locus	Forward Forward	Reverse Reverse	Grandezza frammento <i>Fragment size (bp)</i>
BTA3250	Tgcgtttcaaaatggaacag	gggactccaagatgcaatg	283
BTA5343	Accgcagaggtgattaatgg	caagggttgagctggtttgt	226
BTA6343	Catcgaccagaaccgtgac	ctcactgggtgggggaagt	221
BTA2019	Gaagaggggcaaggagag	tcaggagtgaggcaggaaat	151
BTA5597	Ggttgccctctacacctg	ttcctctcaggggttacct	100
BTA4575	Cagaagggcaggactgacac	tggtaagaaccagaccaga	159
BTA4083	Aagacagggacaccaaccac	agttccagctgttctctg	207
BTA5033	Ttccggagacagctctcta	atgggtgggagccctttaat	235
BTA5089	Tgtgcttgcctctacacat	tctgcacttgatggcagga	170
BTA2121	Getcgetgcttctctgtag	aggcaatgttggcaaaaca	201
BTA4081	Atcctcattggggagatggt	agagagctcaggggagacg	209
BTA3144	Tctactgcctgctccgatt	tctcctgtctgggaagagc	161
BTA2889	Cctactcccagccaagcag	agaagtagcctgggggaggt	130
BTA5067	Ctctggtgggtgtggaatg	ttgcccacctctcagatcc	110
BTA6899	Ttetgacagctgctcactgc	tcttgggtcctgattcca	150
BTA3463	Caagcagaggaggtccagag	acctcctgggaagaaaagg	114
BTA5279	Acttgccattgttctaggttctg	tgtatattgtctgtctcccattc	100
BTA3635	Gcctcactcccagtgtaaa	agcgtgatcaaggcagaact	98
BTA5915	Ctttgacctggagcagcac	atcctcaggggtcacctggtt	150

Tabella 2 – Nome del locus, primer delle sonde e basi individuate nei punti di mutazione (alleli)
Table 2 – The list of 19 analyzed locus, the relative probe's primers and the bases present in the mutation point (alleles)

Locus Locus	primer delle sonde <i>probe's primers</i>	Alleli Alleles
BTA3250	18(c)ttc ccc agt ctc agg tct	G,A
BTA5343	ctt tga acc ggg ctg caa	A,G
BTA6343	6(c)cag ccc ctc tca cac cag	G,C
BTA2019	18(c)gtg gct cca tcc tcc cct	C,A
BTA5597	18(c)cta gct aga aca aag gct	G,T
BTA4575	42(c)gct cca tca cct ctc atc	G,A
BTA4083	36(c)aaa aga ctg tag aga gca	T,C
BTA5033	30(c) tgt ggg caa tcc ctt agc	T,C
BTA5089	30(c)gtc ttt aca gta atg ctc	G,T
BTA2121	ttt aag gtt att tat tta aa	G,T
BTA4081	30(c)cct agc ctc agg gct tcc	G,A

BTA3144	24(c)tca gat tgc ctg att tcc	T,G
BTA2889	24(c)ttc gag ctg att gcc acc	T,C
BTA5067	12(c)aat ggg aga ccc gcg g	C,A
BTA6899	12(c)cta ccc tac ctc agg cct	C,G
BTA3463	24(c) tca aaa tct gag act tgt a	C,T
BTA5279	6(c)ttt gct ctg ttt tgt tca	A,G
BTA3635	6(c)act tcc tct gtg aca aca	G,A
BTA5915	36(c)cgc ggg tgc gaa ggt ccc	T,C

Tabella 3 – Confronto tra due genotipi (Bulbo – Carne) identici e tra due differenti
 Table 3 – Comparison between two identical and different genotypes (Hair – Meat)

Genotipi identici			Genotipi differenti		
<i>Identical genotypes</i>			Different genotypes		
Locus Locus	Camp. n° 1	Camp. n° 2	Locus <i>Locus</i>	Camp. n° 3	Camp. n° 4
	<i>(sample n.1)</i>	<i>(sample n.2)</i>		<i>(sample n.3)</i>	<i>(sample n.4)</i>
	DNA da bulbo	DNA da carne		DNA da bulbo	DNA da carne
	<i>(hair roots)</i>	<i>(meat)</i>		<i>(hair roots)</i>	<i>(meat)</i>
BTA3250	G/A	G/A	MBS042-1	G/A	A
BTA5343	A	A	MBS029-1	A	A
BTA6343	G	G	MBS048-1	G	G
BTA2019	C/A	C/A	MBS007-1	A	A
BTA5597	G	G	MBS043-1	G	G/T
BTA4575	G/A	G/A	MBS044-1	A	G/A
BTA4083	C	C	MBS014-1	T/C	T
BTA5033	C	C	MBS046-1	T	T/C
BTA5089	T	T	MBS047-1	G	G/T
BTA2121	G	G	MBS018-1	G/T	G
BTA4081	G/A	G/A	MBS020-1	G/A	G
BTA3144	T/G	T/G	MBS021-1	T/G	T/G
BTA2889	C	C	MBS034-1	T	T/C
BTA5067	C/A	C/A	MBS051-1	C	C/A
BTA6899	C/G	C/G	MBS049-1	C	G
BTA3463	C	C	MBS025-1	T	T
BTA5279	G	G	MBS035-1	G	A
BTA3635	G/A	G/A	MBS028-1	G/A	A
BTA5915	T/C	T/C	MBS051-1	T/C	T/C

BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

- Heaton M. P., Harhay G.P., Bennet G., Stone R.T., Grosse W., Casas E., Keele J., Smith T., Laegreid W. 2002. Mammalian Genome 13, 272-281.
- Vignal A., Milan D., San Cristobal S., Eggen A. 2002. Genet. Sel. Evol 34, 275-305.
- Plançon C., Duva D., Henry E., Kucharzak R., Lechner D., Meghen C., Angiolillo A., Sanchez A., Gut I. 2004. Proc.29th Intern. Conf. on Animal Genetics ISAG – Tokio E033, 89
- Bernat M., Titos E., Claria J. 2002. Genet. Mol. Res. 1 (1), 72-78.
- Blasi M., Lanza A., Genuini E., Dall'Olivo S. 2001. Proc. XIV Cong. Naz. ASPA Firenze 97 –99.

A NEW SNPs PANEL FOR CATTLE BEEF TRACEABILITY

Blasi M. (1), Lanza A. (1), Genzini E. (1), Sassano A. (2)

ABSTRACT - L.G.S. Laboratorio di Genetica e Servizi, since 1980 in service of the Italian livestock industry, is developing a new protocol, based on a new type of genetic marker, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), for identity and meat traceability. In order to define the SNP panel two different biological tissues from 100 Podolica Breed animals were collected: hair roots from alive animals and muscle fragments after slaughter. The comparison between the two DNA samples was made using 19 SNPs selected from those of public domain. SNPs can become the standard marker for identity and meat traceability because of the ease of scoring, low cost assay development and high-throughput capability.

KEYWORDS: Traceability, Meat, DNA, SNPs.

INTRODUCTION

Molecular biology laboratories, carrying out researches in the field of livestock, participate also to the gene mapping programme. The aim of this work is finding a good number of genetic markers, highly polymorphic, distributed among chromosomes, to increase the rate of genetic improvement in cattle. Such a high number of markers gives an extremely powerful instrument for the right genetic identification of animals, for parentage testing and genetic traceability of animal products. To achieve this aim till today is used a polymorphic type of DNA markers: the microsatellites. Microsatellites have strict limits: high cost of analysis and few fastness in performing analysis. Now a day animal molecular biology laboratories all over the world are studying a very new class of genetic marker, Single Nucleotide Polymorphisms. SNPs are single nucleotide mutations spread all over the genome and they are the most frequent DNA markers (one every 500-1000 nucleotides). These markers are almost always biallelic and can be analyzed by completely automatic systems, high throughput, in a binary way (Vignal *et al.*, 2002). The aim of this study is to develop a new protocol for the individual identification and meat traceability through the analysis of SNPs selected from those of public domain (Heaton *et al.* 2002; Plancon *et al.* 2004). These markers present the following peculiarity:

- frequency of each allele close to 50%
- heterozygote genotype frequency close to 10%
- different chromosome localization
- must not be in linkage disequilibrium
- follow Mendelian inheritance.

MATERIALS AND METHODS

Two different biological material typologies have been taken from 100 Podolica breed cattle in Potenza and Matera's farms: a tuft of hair during the breeding and a fragment of muscular tissue after the slaughter. DNA was extracted from these 200 samples, using a protocol based on the use of 2 surface-active agents: Tween 20 and NP40. The list of 19 analyzed markers, the relative SNP and the size of the amplified fragments are described in the Table 1. The amplification was carried out in a 25 µl reaction volume containing 100ng DNA, 1x PCR buffer, 0.75mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 40 µM primers and 0.5 U Taq DNA polymerase. The amplification was performed in a DNA Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems) with a denaturation of 30'' at 94°C, annealing at 55°C and extension of 1' at 72°C, for 35 cycles, final extension of 10' at 72°C. DNA fragments were loaded on 3% agarose gel containing ethidium bromide and visualised on a long wavelength UV transilluminator. We used the technique of ddNTPs single base extension to determine SNP genotype. The list of 19 analyzed SNPs, the relative probe's primers and the bases present in the mutation point (alleles) are described in the Table 2. We carried out a mini sequencing composed by the single nucleotide where there is the mutation. The used primer, besides being complementary to the template, must also be adjacent

to mutation's point. In the reaction, in addition to the template, the not fluorescent primer and DNA polymerase, there are 4 ddNTPs; each of these is labelled with a fluorochrome (A-dye terminator is labelled with R6G; C- dye terminator is labelled with TAMRA; G- dye terminator is labelled with R110 and T- dye terminator is labelled with ROX). During the sequencing reaction, the primer extends itself, incorporating only one ddNTPs (complementary to template's sequence). The next electrophoresis run and the analysis with particular software allows to determine what bases is present in the point of the mutation. The electrophoresis will show only one peak if the sample is homozygote for the analysed SNPs; on the other side, there will be two different peaks if the sample is heterozygote. The colour of the peak will identify the present nucleotide: a green peak indicates the presence of Adenina; a red peak indicates the presence of Timina; a black peak indicates the presence of Citosina and a blue peak indicates the presence of Guanina. (BERNAT *et al.* 2002). For our trial, we used Kit Snapshot ddNTPs Primer Extension (P.E. Applied Biosystems). The reaction was carried out in a 10µl volume containing 0.15 pmol/µl of amplified DNA, 0.15 pmol/µl of primer and 5µl of Snapshot Ready Reaction Mixture. The reactions were performed in a DNA Thermal Cycler with 25 cycles of 10'' at 96°C, 5'' at 50°C and 30'' at 60°C. An aliquot of the reaction (1µl) was incubated with 12µl of formamide and 1µl of Genescan LIZ120 size standard, and performed on a sequencer ABI3100 Avant Genetic Analyzer and analyzed using Genescan Analysis Software (PE Applied Biosystem). In order to verify the accuracy of the results obtained with this SNPs traceability protocol we compared the results using the microsatellites technique too. Nine microsatellites (TGLA227, BM2113, BM1824, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH225 and ETH10) were amplified in a single multiple PCR (Blasi *et al.*, 2001). The PCR products were mixed with GeneScan 350 ROX internal size standard before loading in a single gel lane for electrophoresis. Gel electrophoresis and genotype determination were performed on an ABI Prism 3100 DNA Sequencer equipped with GeneScan and Genotyper softwares.

RESULTS AND DISCUSSION

After determined the genotype of each sample, related to the 19 analyzed SNPs, we compared DNA extracted from hair and DNA extracted from muscular tissue, after slaughter. The two genotypes must be identical, because the genetic inheritance of an individual is identical in all his cells. We made this comparison using a particular software, that was generated in LGS, in collaboration with Italservice, the data processing society of the Italian Breeders' Association. In the table 3 it's shown the comparison between two identical genotypes and two different genotypes. Using this protocol, we identified 15 incompatibilities, comparing the genotype from hair and the genotype from muscular tissue. This protocol can be used for verify the cases of cattle-stealing, false identification and wrong parentage. In order to complete our work, we are looking for determine the allelic, genotype frequencies and Probability of Exclusion (PE) related to all Italian cattle meat breeds.