

ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA DIFFERENTI FONTI TISSUTALI ANIMALI PER LA COSTITUZIONE DI UNA BANCA DEL GENOMA DELLA RAZZA CHIANINA

Lasagna E. (1), Sarti F. M. (1), Sorbolini S. (1), De Martino F. (1), Panella F. (1)

Dipartimento di Scienze Zootecniche - Università degli Studi di Perugia – Borgo xx giugno, 74, 06121 Perugia, Italy.

RIASSUNTO: E' stata comparata l'estrazione di DNA da differenti fonti tissutali animali in termini di rese, costo e metodiche operative impiegate. Il DNA ottenuto è utilizzabile per le procedure di tracciabilità dei prodotti di origine animale, nonché per tutte le analisi volte all'accertamento delle esatte genealogie. Le estrazioni di DNA sono state effettuate, con differenti protocolli operativi, a partire da sangue, cartilagine del padiglione auricolare e bulbi piliferi prelevati da venti bovini di razza Chianina. I risultati hanno messo in evidenza la piena idoneità dei tre tessuti come fonti di DNA. Alcune considerazioni di natura tecnico-economica confermano la convenienza di utilizzare il bulbo pilifero per gli impieghi di tracciabilità e di accertamento di parentela. In altre applicazioni, quali la costituzione di una banca del genoma, in cui necessitano notevoli quantità di DNA con elevata purezza, è opportuno preferire il sangue.

PAROLE CHIAVE: DNA genomico, Sangue intero, Cartilagine, Bulbo pilifero, Rese, Costi.

INTRODUZIONE

Anche nel settore zootecnico, in questi ultimi anni, ha avuto un consistente sviluppo lo studio degli acidi nucleici, in particolar modo, del DNA. Notevoli sono infatti le implicazioni connesse con lo studio del genoma degli animali in produzione zootecnica specialmente in prospettiva di un utilizzo applicativo di tali conoscenze. Basti pensare a tutte le procedure di tracciabilità dei prodotti alimentari di origine animale: tali tecniche si basano, di fatto, sull'utilizzo del DNA al fine di garantire l'esatta e veritiera provenienza degli alimenti. Nel settore del miglioramento genetico animale, tradizionalmente di tipo quantitativo, sta avendo sempre maggior interesse lo studio molecolare del genoma. L'utilizzo dei marcatori molecolari sta così entrando a far parte del processo selettivo (Marker Assisted Selection). In tutte le circostanze la prima fase è rappresentata dall'estrazione e purificazione dell'acido nucleico.

MATERIALI E METODI

Tutti i campioni biologici sono stati prelevati da 20 bovini di razza Chianina allevati presso l'Az. Agr. Luchetti Basilio e Claudio (Collazione – PG).

Estrazione di DNA da sangue intero

L'estrazione del DNA da sangue è stata effettuata a partire da 200 µl di sangue mediante kit SIGMA G1N, utilizzando il protocollo specifico per il sangue intero, cui si apportavano, tuttavia, alcune modifiche per ottimizzare l'estrazione (Sambrook & Russel, 1989). I campioni di DNA, sono stati sottoposti a determinazione quantitativa, mediante spettrofotometro e, qualitativa, mediante corsa elettroforetica (50 V) in gel di agarosio allo 0,8 % in tampone di TBE 1 X.

Estrazione di DNA da campioni di cartilagine

In questo caso i campioni biologici sono stati prelevati mediante un sistema denominato "traceback" messo a punto dalla ditta Identigen. La metodica prevede l'utilizzo di uno specifico marchio auricolare e di un apposito etichettatore: il marchio auricolare, oltre alla sua funzione standard di identificazione dell'animale, permette di raccogliere un campione di tessuto nel

momento in cui viene posizionato. Il campione risulta quindi formato da una sezione del padiglione auricolare, costituita da frammento cartilagineo e da due lembi di derma.

Anche in questo caso è stato predisposto un protocollo di lavoro specifico che consente di lisare i campioni prima della fase di estrazione. L'estrazione è stata effettuata tramite il kit SIGMA GIN utilizzando il protocollo consigliato per l'estrazione del DNA dalle code dei roditori, apportando tuttavia qualche necessaria modifica (Sambrook & Russel, 1989). I campioni di DNA sono stati sottoposti a determinazione quantitativa e qualitativa con le modalità prima menzionate.

Estrazione di DNA da campioni di bulbo pilifero

I campioni di bulbo pilifero sono stati prelevati strappandoli a mano o con l'ausilio di una pinza dalla regione del sincipite e dal fiocco della coda. Non sempre il pelo estirpato dalla cute porta con sé il bulbo pilifero, è buona norma quindi accertarsi sempre della sua presenza, dal momento che un campione di pelo privo del bulbo è inutilizzabile per l'estrazione del DNA. Il protocollo è stato reperito in bibliografia (Healy *et al.*, 1995) apportando poi alcune modifiche al fine di ottimizzare i risultati. L'estrazione veniva condotta utilizzando 30 bulbi piliferi accuratamente selezionati. I campioni di DNA ottenuti dopo l'estrazione, sono stati sottoposti a determinazione quantitativa, mediante fluorimetro e, qualitativa, mediante corsa elettroforetica (50 V) in gel di agarosio allo 0,8 % in tampone di TBE 1 X.

Controllo qualità DNA ottenuto

Il DNA ottenuto a partire da campioni di cartilagine e bulbo pilifero è stato sottoposto anche ad un controllo qualitativo mediante PCR (reazione a catena della polimerasi). Tale controllo è stato effettuato solo sul DNA proveniente dalle due fonti prima menzionate dal momento che questo presentava, alla valutazione qualitativa in gel d'agarosio, dei segni di degradazione.

Le singole reazioni di PCR sono state condotte, utilizzando come primer specifici due oligonucleotidi che riconoscevano una porzione del gene per la k-caseina bovina (Pinder *et al.*, 1991). È stato effettuato un controllo negativo senza DNA stampo in ciascuna serie di reazioni. Tutte le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando un termociclatore Perkin Elmer 9700; i prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica (100 V) in gel d'agarosio all'1,2% in tampone TAE 0,5X e visualizzati mediante esposizione ad un transilluminatore a raggi ultravioletti.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

La quantità media di DNA ottenibile da sangue intero risulta essere quantitativamente soddisfacente (7,19 µg) e piuttosto costante (deviazione standard 1,28 µg). Per quanto riguarda la purezza il valore medio, pari a 1,65 denota una scarsa contaminazione da parte di sostanze che residuano dal processo di estrazione. Tenendo inoltre presenti le modalità operative va considerato che il prelievo del campione di sangue, pur risultando piuttosto economico, richiede tuttavia l'impiego di personale specializzato.

Andando a considerare invece i dati relativi all'utilizzo della cartilagine appare evidente come le quantità medie di acido nucleico ottenibili siano decisamente più elevate rispetto al sangue (16,82 µg vs 7,19 µg); altrettanto evidente è però anche la variabilità (ds=10,43). Il motivo di questa forte disomogeneità potrebbe essere dovuto alla composizione stessa del campione: analizzando i campioni si è notato che, a volte, solo una delle due porzioni di derma era presente; l'altra veniva, probabilmente, persa durante il prelievo comportando così una diminuzione nella resa in DNA. Non vi sono invece differenze degne di nota per quanto riguarda la purezza che risulta essere, anche in questo caso, prossima a 1,7. Anche in questo caso si rende necessaria la presenza di personale qualificato per il prelievo del campione.

Le rese medie riscontrate, con l'utilizzo del bulbo pilifero, sono decisamente inferiori (598 ng) con apprezzabile variabilità (deviazione standard 331,22 ng). Un esame della bibliografia (Pfeiffer *et al.*, 2004) lasciava presupporre rese piuttosto basse: per tale motivo i campioni di DNA sono stati sottoposti, a differenza di quelli provenienti da altri tessuti, a determinazione

quantitativa mediante fluorimetro. Tale metodica di quantificazione non consente di avere informazioni relativamente al grado di purezza del materiale ottenibile; la bibliografia (Pfeiffer *et al.*, 2004) riferisce, inoltre, di DNA parzialmente degradato. Per quanto riguarda il reperimento del campione si può affermare che il prelievo non è invasivo per l'animale e l'esecuzione talmente facile da poter essere effettuata anche da personale non qualificato.

La presenza di DNA degradato in due dei tre tessuti a confronto (cartilagine e bulbo pilifero) ha reso necessario un ulteriore controllo qualitativo dello stesso. E' stato messo in evidenza come, in entrambi i casi, il DNA sia risultato perfettamente idoneo per la conduzione di una reazione di PCR e come le quantità e la purezza dei DNA stampo iniziali non abbiano in alcun modo influenzato la quantità di amplificato ottenibile. Nella tabella 1, infine, è stata effettuata una comparazione tra alcuni parametri che caratterizzano ciascuna fonte di DNA quali la difficoltà e i costi unitari di prelievo del campione, l'estrazione del DNA e il tempo per l'estrazione dello stesso. Dalla tabella appare evidente che il bulbo pilifero risulta essere la fonte più vantaggiosa sia per quanto riguarda la facilità ed economicità del prelievo del campione, sia per quanto riguarda il basso costo di estrazione; per contro è la fonte peggiore per quantità e qualità di DNA estratto.

CONCLUSIONI

Tutti e tre i tessuti presi in considerazione, come era logico aspettarsi e come già descritto in bibliografia, si sono rivelati idonee fonti di DNA da utilizzare in biologia molecolare. Volendo effettuare una discriminazione è necessario prendere in considerazione alcuni aspetti tecnici ed economici. Buona parte delle considerazioni portano all'individuazione del bulbo pilifero come fonte idonea di DNA per le analisi di tracciabilità e di accertamento di parentela, mentre non può essere considerato una fonte ideale per estrarre DNA da destinare ad analisi più complesse. E' necessario, infatti, effettuare delle precisazioni: tale DNA può senza dubbio essere validamente utilizzato per tutte quelle tecniche di biologia molecolare che si basano sulla reazione a catena della polimerasi (PCR). Nel caso però in cui il DNA debba essere conservato, anche per lunghi periodi (costituzione di banche del genoma, utilizzi futuri, ecc.), emergono non poche perplessità circa la sua stabilità, essendo caratterizzato da bassi valori di purezza e, pertanto, suscettibile di degradazione. In tali situazioni sarebbe senza dubbio preferibile affidarsi a fonti tissutali decisamente migliori quale il sangue, che consente di ottenere quantità molto superiori di DNA pressoché privo di impurezze e ben integro nella sua struttura.

In alternativa, una soluzione che sembra combinare ottimamente dei costi accettabili con una ottima qualità nonché conservabilità del DNA è rappresentata dall'utilizzo di cartine adsorbenti in cui si provvede a spottare il sangue dopo il prelievo.

Tabella 1 – Comparazione di alcuni parametri tecnici delle tre fonti tissutali di DNA.

Table 1 – Comparison of some technical parameters of the three DNA tissutal sources

	Sangue <i>Blood</i>	Cartilagine <i>Cartilage</i>	Bulbo pilifero <i>Hair follicle</i>
Difficoltà prelievo campione <i>Difficulty for sample collection</i>	Alta <i>High</i>	Media <i>Mean</i>	Bassa <i>Low</i>
Costo unitario prelievo campione <i>Unitary cost for sample collection</i>	≅1 €	≅3 €	Nessuna spesa <i>No cost</i>
Tempo estrazione DNA <i>Time for DNA extraction</i>	≅1 h	≅6 h	≅1 h
Costo unitario estrazione DNA <i>Unitary cost for DNA extraction</i>	≅2,50 €	≅2,50 €	≅0,70 €

BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

- Healy P. J., Dennis J. A., Moule J. F., 1995, Australian Veterinary Journal, 72, 392-392.
- Pfeiffer I., Völkel I., Täubert H., Brenig B., 2004, Forensic Science International, 141, 149-151.
- Pinder S. J., Perry B. N., Skidmore C. J., Savva D., 1991, Animal Genetics, 22, 11-20.
- Sambrook J., Russel D. W., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989.

RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato realizzato grazie al contributo finanziario dell'APA di Perugia a cui vanno i più sentiti ringraziamenti. Un ulteriore senso di gratitudine va all'Az. Agraria Luchetti Basilio e Claudio.

EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM DIFFERENT ANIMAL TISSUES IN ORDER TO COSTITUTE A GENOME BANK OF CHIANTINA BREED

Lasagna E. (1), Sarti F. M. (1), Sorbolini S. (1), De Martino F. (1), Panella F. (1)

ABSTRACT: The extraction of DNA from different animal tissutal sources was analyzed about the costs, the yields and operative way. The DNA obtained is suitable to traceability of feed animal derived and for all analysis to ascertain exacts genealogy. Different operative ways have been used to extract the DNA from blood, cartilage of auricle and hair follicles drawn from twenty calves of Chianina breed. The results show that all the three tissues are suitable like source of DNA. From the economical and operative points of view the air follicles can be properly used for the traceability and for the parental ascertainment applications. On the contrary if high quantity of DNA with good purity is needed the blood is more suitable.

KEYWORDS: Genomic DNA, Whoole blood, Hair follicles, Yelds, Costs.

INTRODUCTION

Also in animal industry, in the last years, is improving the importance of the molecular study of DNA. The animal genome can infact have many applications such as in the traceability of animal derived feed or in the new ways in animal breeding such as the marker assisted selection. In all the situations the first step is the extraction and purification of the DNA.

MATERIALS AND METHODS

All the biological samples were taken from twenty calves of Chianina breed reared in Luchetti's farm (Collazzone -PG).

DNA extraction from whoole blood

The DNA extraction was done from 200 µl of blood by a Sigma G1N kit applying the specific protocol for whoole blood with some modifications. In the sample of DNA, was determined the quantity by spectrofotometer and the quality by electrophoresis (50 V) in agarose gel (0.8%) in TBE 1 X buffer (Sambrook & Russel, 1989).

DNA extraction from cartilage

The biological samples were obtained by the traceback system of Identigen. This method utilizes a specific auricular mark that, when placed in the ear, allow to get a section of the auricle composed by derma and cartilage. Also in this case was setted up a specific protocol.

The DNA extraction was done by the Sigma G1N kit used for rodents tail; the quantity and quality of the DNA samples were done as related before.

DNA extraction by hair follicles

The hair follicles samples were taken in the sincipit or in the tail by hand or by pincers. The extraction (Healy *et al.*, 1995) was done utilizing 30 selected hair follicles. The DNA extracted samples were quantitatively determined by fluorimeter and qualitatively by electrophoresis (50 V) in agarose gel (0.8%) in TBE 1 X buffer.

DNA quality control

The DNA samples extracted from cartilage and hair follicles were submitted to a qualitative control by PCR (polimerase chain reaction) because in these two cases the qualitative control showed a smear that is a clear sign of partial DNA degradation. The PCR reaction were done utilizing as specific primers two oligonucleotides that recognised a gene portion for the bovine k casein (Pinder *et al.*, 1991). A negative control without template DNA was carried out in each series of reactions. In all PCR reaction was used a Perkin Elmer 9700 thermal cicler. The PCR products were tested in electrophoresis (100 V) in agarose gel (1.2%) in the 0.5 X TAE buffer and visualised with the esposition to the UV transilluminator.

RESULTS AND DISCUSSION

The average DNA quantity that is possible to obtain from whoole blood is satisfactory (7.19 µg) and quite constant (s.d. 1.28 µg). About the purity the average equal to 1.65 show a poor contamination by residual substances from extraction. About the operative way must be taken into account that the blood drawing must be done by specialized technicians. About the cartilage the DNA quantitatives are higher then that of blood (16.82 vs 7.19 µg), but higher is also the variability (s.d. 10.43 µg); thea cause of this disomogeneity should be done at the sample composition, as a matter of fact sometimes only one parte of the derma was in the sample and that determined a reduction of DNA. There are not difference about the purity that is close to 1.7. Also this tissue must be taken by specialized technicians. The average yields from hair follicles are lower (598 ng) with high variability (s.d. 331.22 ng). Because the literature (Pfeiffer *et al.*, 2004) reported quite low DNA yields for this tissue, the quantity of DNA in these samples was determined by fluorimeter; this method doesn't allow to have informations about the purity of the DNA that, always according to the literature shold be partially degradates. The samples is easy to obtain by not specialized staff. Because of the degraded DNA in two of three compared tissues (cartilage and hair follicles) it's was needed a further qualitative control. It was ascertained that, in both the cases, the DNA resulted suitable to a PCR reaction and the purity and quantity of the initial template DNA didn't influence the quantity of the obtenaible amplified. Table 1 shows, finally, a comparison between some parameters of each source of DNA such as difficulty and unitary cost of drawing sample, the extraction of DNA and the time necessary for the extraction of the same. In Table 1 is manifest that the hair follicles are the most profitable source both for the facility and economy of drawing sample and for the low cost of extraction; on the opposite it is he worst source as DNA quality and quantity.

CONCLUSIONS

All the three analysed tissues, as riported in literature, were useful to utilise in molecular biology. Considering some technical and economical parameters it's possible to do some considerations. The hair follicles is the optimal source of DNA for the traceability and for the parental ascertainment applications. This DNA can be utilised for all techniques that are based on polimerase chain reaction (PCR); if this DNA should be utilized to be stored for long periods (i.e. the costitution of genome bank) there are some doubts about stability for its poor purity. For this purpose seems to be more suitable the DNA derived from blood. Blood allows to obtain a high quality DNA as structure and as purity. Alternately a solution that combine

low costs with high quality and storability of DNA is represented by a system based on adsorbent cards in which spots the blood after the drawing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work it was realized with the economical support of the APA of Perugia. Special thanks to Luchetti's farm (Collazone - PG).