



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Sanità Pubblica Patologia Comparata e d'Igiene
Veterinaria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Veterinarie

INDIRIZZO: Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Comparata

CICLO XX

TITOLO TESI

**Sviluppo di Metodologie Molecolari per la Qualità dei Prodotti di
Origine Animale**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Marco Martini

Supervisore :Ch.mo Prof. Enrico Novelli

Dottorando : Federico Pacini

RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio era di sviluppare e ottimizzare tecniche molecolari per la individuazione di varianti alleliche o di SNPs in geni coinvolti nella qualità dei alcuni prodotti di origine animale.

Per l'industria casearia l'identificazione della variante B dell'allele della k-caseina bovina (CSN3*B) è molto importante per il ruolo che la proteina codificante ha durante la caseificazione. E' noto che l'allele B gioca un ruolo fondamentale nella lavorazione dei prodotti a base di latte; gli effetti nella qualità e nella quantità del latte prodotto è ampiamente riportata. La disponibilità di protocolli accurati e di facile applicazione per l'identificazione dei suoi più comuni alleli è sempre di grande interesse per i progetti di selezione.

In questo studio, un metodo basato sull'utilizzo di una soluzione denaturante appositamente sviluppata per la DNA melting analysis è in grado di identificare gli alleli A e B della k-caseina. Il metodo denominato denaturant DNA melting analysis è veloce, sensibile e affidabile per l'identificazione di alleli della k-caseina. Lo sviluppo di una apposita soluzione denaturante permette di incrementare la risoluzione ottenibile dalla strumentazione.

Analogo approccio è stato utilizzato per l'identificazione di SNPs in due importanti geni coinvolti nella qualità della carne usando una strumentazione appositamente sviluppata per l'analisi del melting.

Il geni RYR1 e PRKAG3 hanno un ruolo importante nella qualità della carne, influenzando il pH, il contenuto di acqua, il contenuto grasso e il colore. Le frequenze alleliche di questi geni è stata studiata da maiali

provenienti dalla Baviera, dall'Austria e dal Sudtirolo.

Successivamente è stato possibile comparare la sensibilità ottenibile utilizzando o non utilizzando la soluzione denaturante.

Le frequenze osservate sono: 0,86, 0,13 e 0,01 per i genotipi N/N, N/n e n/n per il gene RYR1, mentre di 0,17, 0,54, 0,29 per i genotipi I/I, I/V, V/V per il gene PRKAG3.

E' interessante notare che anche se i campioni analizzati provenivano da maiali selezionati per il contenuto di carne e la sua qualità, una relativamente alta frequenza del genotipo N/n e relativamente bassa frequenza del genotipo I/I è stata trovata. In queste produzioni, dove la qualità della carne è un importante parametro, potrebbe essere possibile incrementare le frequenze degli alleli e gli SNPs più favorevoli.

Questo approccio per l'identificazione di SNP noti è facile ed affidabile e potrebbe sostituire il tradizionale uso di enzimi di restrizione per l'identificazione di specifiche sostituzioni.

SUMMARY

The objectives of this study were to develop and optimize molecular techniques based on the DNA melting analysis for the detection of allele variants or SNPs in genes involved in the quality of animal products.

For the dairy industry the detection of the cow κ -casein B allele (CSN3*B) is very important for the role of its codifying protein during the cheese making. It is known that the κ -casein B allele plays a major role in cheese technology with great effects in the quality and quantity of cow milk. The availability of accurate and reliable protocols for the identification of the most common alleles is of great interest in breeding projects.

In the present study a denominated denaturant DNA melting analysis was developed using a new buffer to quickly identify A and B κ -casein allelic variants. The DNA melting analysis is fast and suitable for the identification of A and B alleles.

The development of this denaturant buffer allows to enhance the discrimination power of the instrumentation. The same approach was used to detect SNPs in two important meat gene quality using an ad-hoc instrument for the melting analysis

The RYR1 and PRKAG3 genes have an important role in the meat quality, influencing the pH, water content, lean meat content and colour. The frequencies of their alleles were investigated in Bayern, Australian and Sudiroler pigs in order to test a high resolution DNA melting analysis protocol, which allows to detect a total of 6 genotypes in simple manner and in few minutes trough a post multiplex PCR.

It was possible to compare the sensibility obtained with the no-denaturant approach against the denaturant approach.

The observed frequencies were: 0.86, 0.13 and 0.01 for the N/N, N/n e n/n respectively for RYR1 gene and 0.17, 0.54, 0.29 for I/I, I/V and V/V for the PRKAG3 gene respectively.

Its is interesting to note that even if the pigs tested belonged to breed with attitude for high meat content and quality, a relatively high genotype frequency N/n and a relatively low genotype frequency I/I were found. In these productions, where meat quality is a relevant attribute, could be possible to enhance the favorable SNPs in bores and sows.

The denaturant buffer developed allows to detect with major detection level the homo/hetero genotypes of the RYR1 and PRKAG3 genes. This approach for the detection of known SNP is very fast, reliable and could substitute the specific enzymatic cleavage for the detection of specific substitutions.

INDICE

1	INTRODUZIONE	pag. 7
1.1	La k-caseina	pag. 14
1.2	I geni PRKAG3 e RYR1	pag. 18
1.3	DNA Melting Analysis	pag. 21
1.4	RFLP	pag. 24
2	MATERIALI E METODI	pag. 25
2.1	Campioni ed estrazione del DNA	pag. 25
2.1.1	Campioni di latte	pag. 25
2.1.2	Campioni di carne	pag. 27
2.2	Amplificazione del gene CSN3	pag. 28
2.3	Amplificazione del geni PRKAG3 e RYR1	pag. 29
2.4	Elettroforesi in gel d'agarosio	pag. 31
2.5	RFLP	pag. 31
2.6	DNA Melting Analysis	pag. 32
2.7	Denaturant DNA Melting Analysis	pag. 32
2.8	Sequenziamento	pag. 33
3	RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 34
3.1	Il gene CSN3	pag. 34
3.2	I geni RYR1 e PRKAG3	pag. 38
4	BIBLIOGRAFIA	pag. 48

1. INTRODUZIONE

Le tecniche di biologia molecolare possono essere impiegate proficuamente per l'individuazione dei tratti genetici più appropriati in un animale affinché i suoi prodotti possano costituire un maggior valore aggiunto al prodotto finito che ne deriva. Nel corso del dottorato di ricerca si ha avuto l'occasione di poter approfondire lo sviluppo di metodologie inerenti ai geni coinvolti nella qualità degli alimenti di origine animale, sia per poter individuare, tramite tecniche di biologia molecolare, se un determinato prodotto non trasformato è maggiormente adatto ad una determinata tipologia di produzione, sia per poter essere di supporto a possibili programmi di selezione che abbiano lo scopo di incrementare qualitativamente la produzione finale.

I prodotti derivanti dal latte bovino sono molto diffusi ed importanti sia dal punto di vista nutrizionale che economico, considerando che nel 2006 erano presenti sul territorio nazionale 1'814'000 capi di vacche da latte e che la produzione di formaggi da latte bovino è stata pari a 1'025 tonnellate (Tab. 1) con un consumo pro-capite di 23,4 Kg di formaggi nel 2005. Inoltre il contenuto percentuale di grasso e proteine nel latte italiano varia da 3,48% al 4,06% e dal 3,25% al 3,43% rispettivamente, con il Trentino Alto-Adige che si posiziona ai vertici della classifica sia per la percentuale di grasso che di proteine, mentre è la Lombardia che riesce a produrre una maggiore quantità per capo (Tab. 2).

x 1.000 ton.	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005(e)	2006
Vacche da latte ('000)	2.078	2.116	2.126	2.172	2.169	1.911	1.913	1.838	1.842	1.814
2)										
Produzione di latte bovino 2)	11.223	11.500	11.032	10.842	10.764	10.743	10.750	10.869	11.162	11.186
± % sull'anno precedente		2,41%	-4,24%	-1,75%	-0,72%	-0,20%	0,06%	1,09%	2,62%	0,21%
<i>Produzione per capo (kg/anno/capo)</i>	5.401	5.435	5.189	4.992	4.963	5.622	5.620	5.913	6.060	6.166
Px Stalla Lombardia (→x 100 lt. + IVA) 1)	36,20	33,54	33,13	33,87	36,65	35,13	33,96	33,83	33,76	32,07
± % sull'anno precedente		-7,9%	-1,2%	2,2%	7,6%	-4,3%	-3,4%	-0,4%	-0,2%	-5,3%
Prezzo stalla Lombardia Lire x lt. (+ IVA)	700,87	649,42	641,0	655,8	709,6	680,21	657,5	655,0	653,69	620,96
Latte ad uso alimentare	3.021	3.001	3.208	2.943	2.944	3.040	2.911	2.871	2.909	2.914
Formaggi										
da latte bovino	799	908	930	927	948	981	980	1.021	1.033	1.025

Consumi pro-capite (kg) 3)										
Latte Alimentare	59,3	67,3	60,9	57,1	58,1	57,9	57,2	57,0	57,6	
Yogurt	4,9	6,3	6,1	6,3	6,4	6,4	6,6	6,3	7,4	
Burro	2,5	3,2	3,2	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	
Formaggi	20,2	21,6	20,4	20,6	22,8	22,2	22,3	22,9	23,4	

Dati aggiornati al 13/12/2007

1) Elaborazione CLAL - Latte a 3,70% MG e 3,25% Proteine(p/v), 2) Fonte ISTAT, 3) Fonte ISMEA

4) Fonte ISTAT fino al 2003, dal 2004 fonte AGEA, (e) = valori stimati

Tabella 1. Dati riguardanti il numero di capi bovini e la produzione di latte in Italia dal 1997 al 2005.

Regione	Italia - Vacche da latte (n. di capi)							
	2004				2005			
	n.di capi ¹	kg latte per vacca ²³	% proteine ²	% grasso ²	n.di capi ¹	kg latte per vacca ²³	% proteine ²	% grasso ²
Piemonte	178.410	8.124	3,27	3,66	175.968	8.272	3,30	3,74
Valle d'Aosta	20.461	3.408	3,28	3,48	20.465	3.457	3,26	3,48
Lombardia	574.937	8.792	3,27	3,62	577.603	8.947	3,28	3,70
Trentino-Alto Adige	103.883	6.673	3,44	4,02	105.862	6.803	3,43	4,06
Veneto	204.459	8.345	3,29	3,66	204.722	8.464	3,28	3,72
Friuli-Venezia Giulia	44.304	7.316	3,33	3,82	44.816	7.381	3,32	3,88
Liguria	3.622	5.569	3,36	3,79	3.592	5.786	3,35	3,84
Emilia-Romagna	277.128	8.140	3,23	3,51	277.022	8.025	3,27	3,65
Toscana	16.747	8.076	3,27	3,55	16.412	8.025	3,27	3,65
Umbria	10.111	8.167	3,21	3,68	10.352	8.118	3,22	3,69
Marche	9.081	7.595	3,28	3,79	8.565	7.488	3,30	3,88
Lazio	84.545	8.444	3,25	3,59	86.022	8.376	3,26	3,66
Abruzzo	22.722	6.564	3,25	3,65	23.044	6.522	3,22	3,71
Molise	20.810	6.163	3,23	3,69	20.760	6.126	3,23	3,69
Campania	71.548	7.515	3,31	3,73	70.292	7.219	3,32	3,75
Puglia	69.636	7.412	3,25	3,50	70.218	7.384	3,26	3,54
Basilicata	24.358	7.631	3,25	3,71	25.199	7.633	3,25	3,75
Calabria	18.659	7.319	3,27	3,66	18.144	7.381	3,25	3,73
Sicilia	49.488	6.438	3,25	3,47	48.795	6.339	3,27	3,54
Sardegna	33.421	8.941	3,26	3,66	34.151	9.043	3,26	3,73
Nord	1.407.204				1.410.050			
Centro	120.484				121.351			
Mezzogiorno	310.642				310.603			
Italia	1.838.330				1.842.004			

Tabella 2. Dati relativi alla distribuzione nazionale dei capi bovini e la relativa percentuale di proteine e grasso.

Le proteine del latte sono suddivise in due grandi categorie in base al loro punto al di sotto o al di sopra il quale precipitano: la frazione solubile del siero, costituita da α -lactoalbumina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg) e la frazione insolubile, costituita a sua volta da quattro diverse caseine : α_s1 -caseina (α_s1 -Cn), α_s2 -caseina (α_s2 -Cn), β -caseina (β -Cn) e k-caseina (k-Cn). Queste proteine sono associate ad un numero variabile di gruppi fosfati e, nel caso della k-caseina, con una parte di carboidrato.

Le α e β -caseine si distinguono dalla k-caseina per la loro tendenza più o meno marcata a precipitare in presenza di ioni calcio. La k-caseina è costituita da due diverse parti che differiscono per la loro solubilità: una di queste (1-105 aa.) è caratterizzata dalla presenza di residui idrofobici, l'altra (106-169 aa.), alla quale sono legati i gruppi carboidrati, manifesta una marcata natura idrofila.

I polimorfismi genetici di queste proteine sono di notevole importanza, dato che, a seconda delle mutazioni puntiformi dell'esone codificante, è stato notato un differente comportamento e caratteristiche lattodinamiche della cagliata, come ad esempio per la k-caseina (Farrell *et al.* 2004, Prinzenberg *et al.* 1999) in cui le varianti alleliche bovine determinano una maggiore o minore attitudine alla caseificazione di tutto il latte. Nella fattispecie la variante B, soprattutto se in omozigosi determina migliori parametri lattodinamici e una maggiore resa in formaggio di tutta la cagliata con considerevoli implicazioni economiche e produttive.

Vari studi sono stati svolti per chiarire eventuali associazioni tra varianti genetiche ed efficienza di riproduzione, capacità di adattamento e tratti produttivi del bestiame come per la rilevazione di eventuale influenza sulle proprietà nutrizionali e tecnologiche del latte. Infatti una

associazione positiva tra contenuto variante B della k-caseina e proprietà tecnologiche del latte è stata osservata: un alto contenuto della variante B, confrontata con la A è associata ad un maggiore contenuto di caseina a ad un migliore resa in formaggio della cagliata (Rahali *et al.* 1991, Schaar *et al.* 1985). Perciò la disponibilità di protocolli, affidabili rapidi ed economici per l'identificazione dei genotipi della k-caseina bovina rimane tuttora di grande interesse per i progetti di breeding e selezione allo scopo di incrementare anche le attitudini alla caseificazione del latte di particolari razze bovine tradizionali autoctone di particolare pregio storico o qualitativo (es. razza Burlina).

Nel breeding dei maiali, gli SNPs correlati con fenotipi interessanti che conferiscono valore aggiunto all'animale e ai suoi prodotti derivati sono molto importanti perché spesso hanno notevoli ricadute sul piano della qualità della carne, delle caratteristiche genetiche, sui tratti riproduttivi ed economici, considerato anche il numero di capi presenti sul territorio nazionale (Tab. 3a, 3b).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Var. 06/05
n° capi ('000)	8.645	8.766	9.166	9.157	8.971	9.200	9.281	0,88

Tabella 3a. Patrimonio suinicolo nazionale.

La medesima importanza la riveste la possibilità diagnostica di discriminare patologie o caratteri qualitativi legati ai prodotti suini.

Una mutazione specifica nel gene per il recettore della riodanina (RYR1)

nel cromosoma 6 è coinvolta nell'attività muscolare e determina la sindrome da ipertermia maligna (MHS); è una miopatia, ereditabile autosomica, in cui gli individui sensibili, esposti ad anestetici come l'alotano, manifestano una contrazione dei muscoli scheletrici ed un aumento della temperatura corporea (Otsu *et al.* 1994). Questa patologia è associata alla sindrome da stress suino (PSS), per la quale i suini sono maggiormente sensibili a condizione di stress, manifestandosi nei casi estremi con rigidità muscolare e morte improvvisa (Allison *et al.* 2005). Inoltre producono carne pallida soffice ed essudativa (PSE) caratterizzata da un colorito pallido, da una tessitura soffice e da bassa capacità di trattenere l'acqua. La carne PSE è di scarsa qualità ed è inadatta per la produzione di molti prodotti lavorati come il prosciutto cotto e crudo. La presenza di animali MHS è, quindi causa di gravi danni economici nella catena di produzione di prodotti suini ed anche una sua eterozigosi è spesso evitata.

Inoltre, gli alleli del gene PRKAG3 determinano un considerevole variazione del potenziale glicolitico tradotto in un basso valore di pH finale, dato dalla degradazione della maggiore quantità di glicogeno in acido lattico. Ciò comporta un deterioramento della qualità della carne nei parametri di: colore, capacità di trattenere l'acqua, perdita di succo, peggiore consistenza, perdita di aroma e minor resa di lavorazione dovuta soprattutto alle maggiori perdite durante la cottura (Enfält *et al.* 1997) similmente alla carne PSE. Quindi si sono considerate le sostituzioni nucleotidiche di questi differenti geni suini (RYR1 e PRKAG3) considerata la loro importanza nella destinazione del prodotto non lavorato e sul contributo che conferiscono alle caratteristiche

organolettiche e fisico-chimiche della carne.

Regioni	Totale	Da ingrasso	Da riproduzione		
			Verri	Scrofe montate	Scrofe altre
Piemonte	969.197	527.882	1.129	56.048	12.349
Valle d'Aosta	699	299	-	-	400
Lombardia	4.118.940	2.126.098	5.169	251.401	55.497
Trentino-Alto Adige	27.470	20.918	86	673	227
Bolzano-Bozen	16.837	13.569	78	443	207
Veneto	729.193	346.317	961	55.274	10.875
Friuli-Venezia Giulia	224.192	110.669	392	15.782	6.009
Liguria	2.825	1.588	16	106	316
Emilia-Romagna	1.611.862	839.163	2.466	93.780	23.530
Toscana	200.265	115.939	572	10.375	1.573
Umbria	256.196	174.214	289	8.833	1.658
Marche	161.613	99.256	228	8.225	1.062
Lazio	87.432	68.100	279	2.464	652
Abruzzo	113.867	71.066	282	5.938	1.279
Molise	52.850	41.641	103	1.270	2405
Campania	145.908	96.808	366	9.903	1.383
Puglia	25.574	14.230	227	1.583	194
Basilicata	74.098	54.125	194	2.334	389
Calabria	119.146	89.109	658	5.519	1.833
Sicilia	47.123	21.872	478	3.799	1.124
Sardegna	232.823	60.644	10.087	57.537	10.409
ITALIA	9.201.273	4.879.938	23.982	590.844	130.999
Nord	7.684.378	3.972.934	10.219	473.064	109.203
Centro	705.506	457.509	1.368	29.897	4.945
Mezzogiorno	811.389	449.495	12.395	87.883	16.851

Fonte: Istat

Tabella 3b. Distribuzione dei capi suinicoli nelle regioni d'Italia nel 2005.

1.1. La k-caseina

Molte tecniche sono state sviluppate allo scopo di distinguere le varianti genetiche delle caseine, in special modo quelle importanti per la caseificazione come la β -caseina e la k-caseina (Van Eenennaam *et al.* 1991): tipizzazione delle proteine del latte direttamente mediante mobilità elettroforetica delle proteine del latte, SSCP (Barroso *et al.* 1998, Prinzenberg *et al.* 1999), PCR-RFLP (Medrano *et al.* 1990, Soria *et al.* 2003) e molto recentemente tramite microarray (Chessa *et al.* 2007), le ultime sono tecniche basate sul DNA che sono state suggerite per la discriminazione allelica della k-caseina.

L'estrazione del DNA inoltre può essere eseguita direttamente da differenti tipi di campioni (latte, sangue, seme) e la genotipizzazione può essere applicata indipendentemente dal sesso dell'animale, dall'età o dallo stato fisiologico di lattazione.

Lo sviluppo di metodiche che permettono la discriminazione di alleli di interesse produttivo e/o qualitativo nei prodotti di origine animale è la parte centrale della presente tesi di dottorato, ponendo l'accento sullo sviluppo di nuove ed innovative metodologie come la DNA melting analysis che come spiegato nei paragrafi successivi è in grado di ottenere grandi risultati in poco tempo.

Il gene codificante la k-caseina bovina è denominato CSN3 e si trova nel cromosoma 6. Come precedentemente detto svolge una funzione chiave durante la caseificazione, in quanto tramite l'intervento del caglio, all'abbattimento del pH e a temperatura adeguate, si ha la precipitazione della caseina, che originerà un coagulo (cagliata) trattenendo, oltre a

proteine, anche percentuali di grasso.

La cagliata verrà tagliata, spurgata e rotta, nonché salata, cotta o stagionata, operazioni che rendono caratterizzante e tipico il prodotto derivante.

A causa delle sue proprietà anfoteriche, la k-caseina gioca il ruolo di colloide verso le altre caseine e costituisce con esse una dispersione nel latte con la formazione di micelle; ognuna di queste è composta da diverse migliaia di molecole di tutte le quattro caseine. Le micelle mantengono all'interno la porzione idrofoba ed espongono la porzione idrofila della k-caseina.

La famiglia della k-caseina consiste di un complesso maggiore libero da carboidrati e dei complessi minori glicosilati con la stessa sequenza amminoacidica ma differenti per natura e numero dei gruppi carboidrati. Nella variante allelica B sono presenti due residui di cisteina che possono formare legami di solfuro intra o inter-molecolari dando origine a varie forme polimeriche. Questi residui possono formare ponti disolfuro con residui -SH liberi della β -lactoglobulina.

La k-caseina è completamente solubile in presenza di ioni calcio e tutte le frazioni di k-caseina sono scisse dalla chimosina. Il sito specifico di attacco di questo enzima è il legame peptidico tra Phe (105) e Met (106) che originerà il primo step della reazione di coagulazione. Data l'importanza e il ruolo chiave della k-caseina si è scelto di mettere a punto un sistema di analisi utilizzando l'esone IV del gene per la k-caseina basato sulla DNA melting analysis, in quanto, in questa porzione è presente la più alta concentrazione di SNPs che determinano il tipo di allele (Fig. 1).

Oltre ai principali alleli A e B, sono stati identificati anche gli alleli E, F, G, H, J, I piuttosto rari e spesso razza-specifici, di cui non è bene chiaro tuttora la loro rilevanza produttiva ed economica sul prodotto finito (Tab. 4) (Farrell *et al.* 2004, Prinzenberg *et al.* 1999).

Table 4 – Discovery and diffusion of the genetic variants of k-casein.

Variant	Year	Species (country)	Breeds (frequency)	Methods	Diffusion	Variations with respect to A or B	References	
⁽¹⁾ A, B	1964	<i>E. taurus</i> (Canada)	Holstein	SGE alkal. pH	All species All breeds	A B Thr(136) → Ile Asp(148) → Ala	Neelin, 1964 [90]	
		<i>E. taurus</i> (Netherlands)					Schmidt, 1964 [91]	
		<i>E. taurus</i> (Australia)					MacKinlay & Wake, 1964 [89]	
		<i>E. taurus</i> (USA)					Woychik, 1964 [92] & 1965 [93]	
C	1978 1979 1983	<i>E. taurus</i> (Italy)	Grey Alpine (0.007)	SGE pH 8.6	Less common Other breeds ⁽²⁾	B C Arg(97) → His	Di Stasio & Merlin, 1978 [94], 1979 [78]	
			Italian Brown				Mariani, 1983 [95]	
B ²	1987	<i>E. taurus</i> (Russia)		cDNA sequencing	Rare	B B ² Ile(153) → Thr	Gorodetskij & Kaledin, 1987 [96]	
E	1989	<i>E. taurus</i> (Germany)	Angler (0.029), German Red and White (0.023), German Friesian (0.06)	IEF	Not very common Other breeds ⁽²⁾	A E Ser(155) → Gly	Erhardt & Senft, 1989 [97]; Erhardt, 1989 [98]	
F	1992	<i>E. taurus</i> (Russia)	Yakut	PCR	Rare	A F Asp(148) → Val	Sulimova <i>et al.</i> , 1992 [99]	
F	1996	<i>E. taurus</i> (Finland)	Finnish Ayrshire (<0.001)	IEF	Rare	A F Arg(10) → His	Ikonen <i>et al.</i> , 1996 [54]	
G	1995	<i>E. grunniens</i> (Russia)		PCR	Rare	A G Asp(148) → Ala	Sulimova <i>et al.</i> , 1996 [100]	
G	1996	<i>E. taurus</i> (Austria, Germany)	Pinzgauer (0.003)	IEF PAGE pH 8.9	Rare	A G Arg(97) → Cys	Erhardt, 1996 [101]	
H	Az ⁽⁴⁾ H	1974	<i>E. indicus</i> (Madagascar)	Madagascan zebu	Triptic hydrolysis	Not common	A H Thr(135) → Ile	Grosclaude <i>et al.</i> , 1974 [19]
			<i>E. taurus</i> (Austria, Germany) <i>E. taurus</i> x <i>E. indicus</i> (Namibia)					
I	1998	<i>E. taurus</i> x <i>E. indicus</i> (Namibia)		SSCP	Rare	A I Ser(104) → Ala	Prinzenberg & Erhardt, 1998 [102]; Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999 [103]	
A(1)	1999	<i>E. indicus</i> <i>E. taurus</i> x <i>E. indicus</i>	Boran, Boran x N'Dama, Friesian x Sahival	SSCP	Rare	None	Prinzenberg & Erhardt, 1999 [104]; Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999 [103]	
J	1999	<i>E. taurus</i> (Ivory Coast, Burkina Faso)	Baoulé (0.02)	Triptic hydrolysis, IEF, RP-HPLC, MS	Rare	B J Ser(155) → Arg	Mahé <i>et al.</i> , 1999 [16]	

⁽¹⁾ Reference (most common) variants.

⁽²⁾ German Simmental [77] and German Fleckvieh [98]; this variant was named k-Cn D, but it is identical to C. k-Cn C variant was found also in Munau-Werdenfeller [105] and Red Holstein [106].

⁽³⁾ Finnish Ayrshire (frequency 0.307) [54] and Italian Brown and Italian Friesian [107].

⁽⁴⁾ The exact name of k-Cn Az variant was “k-Cn A of zebu”.

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism.

1.2. I geni RYR1 e PRKAG3

Vi sono numerosi fattori che possono influenzare il tasso di metabolismo postmortem causando la produzione di questo tipo di carne. Uno dei meccanismi base nella conversione del muscolo in carne dopo la morte dell'animale è la glicolisi, data la mancanza di ossigeno, il glicogeno muscolare viene metabolizzato con la via della glicolisi anaerobica. Questo porta ad una diminuzione del glicogeno e ad un accumulo di acido lattico che abbassa il pH muscolare (Medrano *et al.* 1990).

Lo sviluppo di carne suina PSE è un fenomeno dipendente dal pH e dalla temperatura. Le condizioni PSE sviluppate nel muscolo sono principalmente dovute ad un tasso accelerato di glicolisi nella prima ora post-mortem. Questo provoca una denaturazione proteica maggiore rispetto alla carcassa normale, manifestandosi con elevata perdita d'acqua ed alterazioni delle caratteristiche visibili del muscolo.

L'ereditarietà autosomica della PSS ha suggerito l'esistenza di un gene, a cui questo fenotipo è legato. Per distinguere i soggetti sani da quelli sensibili si verificava la reazione all'anestetico alotano: i soggetti mutati manifestavano MHS mentre i soggetti wt davano una reazione normale (Fàbrega *et al.* 2002).

Confrontando il cDNA del recettore per la rionadina di suini alotano sensibili e di suini alotano non sensibili, è stato identificato il polimorfismo C1843T che, causa una sostituzione dell'aminoacido arginina con una cisteina al residuo 615 della sequenza proteica (R615C), determina il fenotipo HAL (Fujii *et al.* 1991), chiamando N/N, N/n e n/n rispettivamente l'omozigote wild type, l'eterozigote ed il recessivo

mutato.

Per il gene PRKAG3 sono stati definiti due alleli: l'allele wild type recessivo rn^+ e l'allele mutante dominante RN^- . Una successiva caratterizzazione fenotipica rivelò che l'effetto maggiore di questa mutazione era un marcato aumento, di circa il 70%, del contenuto di glicogeno nel muscolo scheletrico mentre il contenuto di glicogeno nel fegato rimaneva normale (Fujii *et al.* 1991). Viene calcolato con la seguente operazione: $2[\text{glicogeno} + \text{glucosio} + \text{glucosio-6-fosfato}] + [\text{lattato}]$ (Enfält *et al.* 1997) (Tab. 5).

PRKAG3 allele	Codon							Population
	30	53	193	194	199	200	372	
1 (RN^-)	ACC T	CTC L	GCC A	CTG L	GTC V	CAA Q	TCT S	H
2 (rn^+)	---	---	---	---	---	-G- R	---	L, LW, WB
3 (rn^+)	---	-C- P	--T -	T-- -	---	-G- R	--C -	H, L, LW, M, WB
4 (rn^+)	-A- N	-C- P	--T -	T-- -	---	-G- R	--C -	D, H
5 (rn^+)	---	-C- P	--T -	T-- -	A-- I	-G- R	--C -	H, LW, WB

Tabella 5. Sostituzioni del gene PRKAG3 in maiali (D) Duroc, (H) Hampshire, (L) Landrace, (LW) Large Withe, (M) Meishan, (WB) Wild Boar.

Questi geni sono importanti per la qualità della carne dei maiali, dato che le mutazione C1843T per il gene RYR1 (Fujii *et al.* 1991), A595G e G599A per il gene PRKAG3 (Milan *et al.* 2000), sono responsabili per una migliore o peggiore caratteristiche chimico-fisico ed organolettiche della carne (Leach *et al.* 1996; Andersson *et al.* 2003). La mutazione ben caratterizzata in letteratura C1843T del gene RYR1 causa la Porcine Stress Syndrome (PSS), una miopatia caratterizzata da un colore pallido, soffice ed essudativa della carne con rilevanti perdite di peso (Fischer, 2007). I maiali con tale sindrome hanno una migliore efficienza in cibo, contenuto magro della carcassa se lo compariamo con in non portatori (Leach *et al.* 1996).

La mutazione del gene PRKAG3 G599A, determina l'allele RN- (Rendement Napole) in nella razza Hampshire, ed è responsabile dell'aumento del potenziale glicolitico nel muscolo scheletrico con effetti indiretti sul pH, contenuto di acqua, contenuto magro (Andersson *et al.* 2003) ma la mutazione puntiforme del gene PRKAG3 A595G che causa il cambio della sequenza proteica (V199I) (Ciobanu *et al.* 2001) sembra avere un ruolo maggiore sul contenuto di glicogeno rispetto la G599A (Cheung *et al.* 2000). La A595 ha un effetto opposto rispetto la 599G abbassando il potenziale glicolitico, incrementando il pH con un migliore colore della carne (Tab. 6).

Traits	I199V		
	II	IV	VV
Ave. glycogen	8.01 (0.31) _{ab} **	9.10 (0.24) _a **	9.37 (0.33) _b **
Ave. lactate	84.83 (1.17) _a ***	86.83 (0.91) _b *	90.54 (1.27) _{ab} ****
Ave. glycolytic potential	100.84 (1.50) _{ab} ****	105.02 (1.17) _{ac} *	109.28 (1.64) _{bc} ****
Packing plant ham pH	5.91 (0.02) _a **	5.89 (0.02)	5.84 (0.02) _a **
Packing plant loin pH	5.80 (0.02) _{ab} ****	5.75 (0.01) _{ac} ***	5.71 (0.02) _{bc} ****
Lab loin pH	5.86 (0.02) _{ab} ****	5.80 (0.01) _{ac} ***	5.77 (0.02) _{bc} ****
Lab loin Minolta	21.54 (0.29) _a **	22.11 (0.22)	22.76 (0.31) _a **
Packing plant loin Hunter	44.17 (0.41) _a *	45.07 (0.32)	45.49 (0.45) _a *
Lab loin Hunter	46.56 (0.30) _a *	47.07 (0.23)	47.70 (0.33) _a *

Tabella 6. Potenziali glicolitici e pH dei diversi alleli per la mutazione V199I (A595G).

Interessante è il fatto che la sostituzione V199I ha un effetto opposto rispetto a R200Q in quanto l'allele con 199I riduce il contenuto di glicogeno cellulare con effetti positivi sulla qualità della carne.

Single nucleotide polymorphism	Genotype	Landrace	Large White	Berkshire	Duroc	Duroc Synthetic
I199V	II	0.02	0.07	0.74	0.17	0.14
	IV	0.23	0.31	0.25	0.44	0.47
	VV	0.75	0.62	0.01	0.39	0.39
	<i>n</i>	569	375	89	260	578

1.3. DNA Melting Analysis

Molte metodiche sono disponibili per lo screening di mutazioni puntiformi (RFLP, SSCP, CE, DDGE, sequenziamento), con differenti

tempi di analisi e costi per campione, che sono essenziali in un programma di breeding. La tecnica sviluppata DNA melting analysis risoluzione è una nuova metodica che permette di non utilizzare sonde marcate o step di separazione e permette la risoluzione di differenze di una base in omozigosi e eterozigosi (Wittwer *et al.* 2003).

L'analisi del melting del DNA è una metodica relativamente nuova che sfrutta i minimi cambiamenti della temperatura di melting (T_m) degli appaiamenti non omologhi per identificarli rispetto agli appaiamenti omologhi. In questo modo, attraverso un gradiente di temperatura, gli eteroduplex avranno una T_m tipica che differirà dagli omoduplex (Fig. 2).

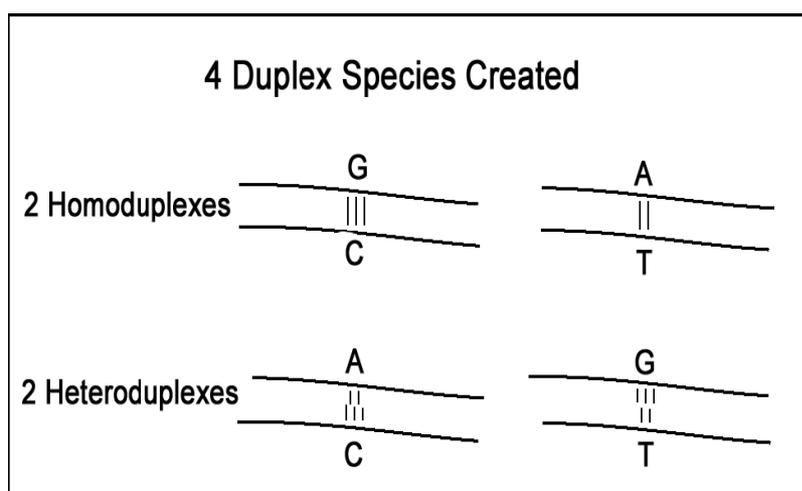


Figura 2. Schema di omoduplex ed eteroduplex.

Gli eteroduplex ed omoduplex si formano naturalmente dopo l'amplificazione con il naturale raffreddamento della reazione, naturalmente, più la composizione nucleotidica dei due alleli sarà simile,

più simile sarà la relativa concentrazione degli eteroduplex rispetto gli omoduplex. La formazione di queste due conformazioni è utile in quanto l'eteroduplex sarà meno stabile dell'omoduplex e quindi differirà nella sua T_m . Per far in modo di visualizzare la loro T_m è necessario utilizzare un fluoroforo intercalante come l'LC Green I o un legante del major groove del DNA come il Sybr Green I. Il fluoroforo dissociandosi dalla doppia elica di DNA ad una determinata temperatura di melting, darà origine ad un repentino abbassamento della fluorescenza. Da tale segnale verrà calcolata la derivata prima negativa in modo da ottenere un grafico interpretabile visualmente (Fig. 5). In questo modo è possibile discriminare gli omozigoti e gli eterozigoti per una determinata mutazione puntiforme, delezione o inserzione. Questa tecnica permette quindi la separazione di picchi di fluorescenza in base alla composizione nucleotidica delle sequenze amplificate in esame (Herrmann *et al.* 2006). Questa tecnica è molto potente, in quanto riesce a discriminare mutazioni puntiformi su frammenti di qualche centinaio di basi, sia incognite che note. Può essere quindi utilizzata per la diagnostica clinica, su determinate mutazioni note, o per la ricerca di mutazioni ancora non note. Il sistema di analisi fa sì che il costo per campione sia notevolmente inferiore ad un sequenziamento, anche se quest'ultimo è certamente più informativo. Esistono ad oggi numerosi “melter” di diverse marche con differenti caratteristiche, sono caratterizzati però dal loro costo. Per questo motivo durante questo dottorato di ricerca è stato sviluppato un sistema di analisi basato sul principio della DNA melting analysis ma utilizzando una soluzione denaturante, da cui il nome denaturant DNA melting analysis. Con tale metodica è possibile ottenere buoni risultati di

discriminazione utilizzando una Real Time PCR che è necessaria per il controllo della temperatura e la rilevazione della fluorescenza. La soluzione denaturante permette di ottenere degli omoduplex e eteroduplex parzialmente denaturanti, in modo da modificare la loro cinetica di melting e permettere un migliore discernimento.

1.4. RFLP

La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) è una metodica assodata per l'analisi dei polimorfismi di lunghezza di un determinato amplificato, in cui la presenza/assenza di uno o più siti di restrizione permette di essere individuato tramite la visualizzazione del digerito solitamente su gel d'agarosio. Se il sito di restrizione cambia perché è presente una mutazione o variazione di sequenza, allora si avrà nel gel un differente profilo di restrizione. Tale metodica è stata utilizzata per confermare il genotipo attribuito ai campioni per il gene RYR1 nella presente ricerca, mentre sempre con la medesima metodica è stato confermato il genotipo per la k-caseina in un precedente progetto.

2. METATERIALI E METODI

2.1. Campioni ed estrazione del DNA

2.1.1. Campioni di latte

Allo scopo di studiare i polimorfismi del locus per la k-caseina e di procedere ad una prima messa a punto del sistema di analisi del DNA tramite melting denaturante sono stati utilizzati 23 campioni di latte. I campioni sono stati refrigerati a 4°C e processati entro 2 giorni dalla data di mungitura, la quale è avvenuta evitando cross contaminazioni di latte da diversi individui in modo da garantire l'affidabilità dei dati ottenuti. Cinquanta ml di latte è stato gentilmente mischiato con un uguale volume del buffer di isolamento (200 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4), mantenuto a temperatura di 22°C per 10 minuti e centrifugato a 12°C per 5 minuti a 3000 g. Lo sviluppo di tale buffer è stato necessario per evitare di dover utilizzare enzimi in grado di proteolizzare le numerose proteine presenti nel latte, in questo modo è stato possibile diminuire il tempo necessario per l'estrazione, rendendola molto più economica e favorire l'estrazione del DNA negli step successivi. Infatti, è noto che le alpha e beta caseine diventano molto più solubili con basse concentrazioni di ioni bivalenti (soprattutto Ca²⁺), per far ciò è stato necessario sviluppare un buffer che contenesse un agente chelante (EDTA) in concentrazione tale da permettere la sottrazione del Ca²⁺ dall'equilibrio micellare in modo da aumentare la solubilità della maggior parte della frazione proteica del latte (alpha e beta caseine) senza avere

un eccessivo residuo di EDTA nelle fasi successive e senza compromettere il pH. Se centrifugassimo altrimenti il campione di latte, senza aver preventivamente aggiunto una alta concentrazione di EDTA nel campione, otterremo una stratificazione della frazione proteica con grosse difficoltà nelle fasi successive nell'estrazione del DNA. Questo sistema ci permette inoltre di non dover utilizzare composti tossici come il cloroformio o il fenolo dato che il precipitato risultante, una volta scartato il surnatante, conterrà una grande quantità di cellule somatiche e la maggior parte della k-caseina che ha però dimensioni molto inferiori rispetto le precedenti. La temperatura di centrifugazione è altresì importante, in quanto permette di far stratificare la frazione fosfolipidica/trigliceridica del latte in superficie e di rendere agevole la sua rimozione manuale.

Successivamente il pellet viene lavato con T₁₀E₁₀₀ buffer (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) in modo da diminuire la concentrazione di EDTA e di eliminare l'EDTA che ha chelato il Ca²⁺ e risospeso in 550 µl di T₅₀E₂₀ buffer (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) in modo da riportare la concentrazione di EDTA alla normalità. Successivamente vengono aggiunti 200 µl di SDS al 10% (p/v) e incubate a 65°C per 30° in agitazione di 700 rpm in un termomixer (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg Germania). Questo step permette la denaturazione termica e la lisi delle proteine rimanenti, la rottura delle cellule e la solubilizzazione di eventuali fosfolipidi/trigliceridi ancora presenti e delle pareti cellulari, l'alta concentrazione di EDTA impedisce alle endonucleasi di restrizione di danneggiare il DNA. Dopo l'aggiunta di 275 µl di acetato di potassio 5 M ed averlo incubato in ghiaccio per 10 minuti, il

DNA è recuperato tramite precipitazione con etanolo 70%/isopropanolo (Sambrook *et al.* 1989). L'aggiunta di acetato di potassio permette una ulteriore denaturazione delle proteine e la precipitazione, con il contributo della bassa temperatura, dello stesso SDS.

2.1.2. Campioni di carne

Allo scopo di studiare i polimorfismi del gene RYR1 e PRKAG3, 30 mg di cute auricolare sono stati prelevati, tramite marca auricolare, ed in modo indolore a 100 maiali provenienti da allevamenti altoatesini, austriaci e bavaresi. Il tessuto, tenuto a contatto nella capsula con un dissecante, viene liberato e lasciato reidratare in 500 μ l di buffer (1M guanidina-HCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM EDTA, 0.5% SDS). Viene poi omogenizzato con l'aiuto di un pestello con 23 μ l di proteasi K (20 mg/ml), 5 μ l of RNase (50 mg/ml) e incubato per 3 ore a 55°C in agitazione a 700 rpm in un termomixer (Eppendorf, USA) fino a che il campione non è completamente lisato dalla proteasi K. Il campione viene centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti e il surnatante trasferito in un nuovo tubo contenente 1 ml di resina Wizard (Promega, USA), la quale lega il DNA liberato. Ciò permette di far passar la mistura risultante attraverso un filtro collegato ad una siringa da 2 ml e di intrappolare il DNA legato alle particelle di silice della Wizard eliminando gli altri componenti in soluzione. Il filtro con la resina viene successivamente lavato con isopropanolo al 80%, centrifugato per 2 minuti a 14000 rpm e lasciato ad asciugare. Utilizzando 100 μ l di TE a 70°C a 10000 rpm per 2

minuti è possibile eluire il DNA con un elevato grado di purezza pronto per poterlo amplificare tramite PCR.

2.2. Amplificazione del gene CSN3

Gli accession number per le sequenze genetiche usate per lo studio in silico sono: GenBank AY380228 e AY380229 per gli alleli CSN3*A e CSN3*B rispettivamente. Per l'allineamento multiplo è stato utilizzato il software ClustalW (Thompson *et al.* 1994), mentre per lo studio del profilo di melting il software Winmelt 2.0.13 (Bio-Rad).

Per amplificare il frammento di 165 bp dell'esone IV del gene per la k-caseina bovina, sono stati utilizzati i primer Csn1 (5'-GCTAGTGGTGAGCCTACAAGTACA-3' e Csn2 (5'-GTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAGAG-3'). Le amplificazioni sono state eseguite su termociclatori Mastercycler (Eppendorf, Germania) e GeneAmp 5700 (Applied Biosystems, USA) in 50 µl di volume contenete 0,2 mM di dNTP, 1X buffer di reazione (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100), 1,5 U di DyNAzyme Taq polimerasi (Celbio, Italy), e 0,2 µM di ogni primer. Le condizioni di amplificazione per i primer Csn1/Csn2 usati per l'analisi del profilo di melting consiste in 35 cicli, 1 minuto a 94°C, 30 secondi di appaiamento a 60°C ed estensione per 1 minuto a 72°C. Il primo ciclo è preceduto da uno step di denaturazione iniziale per 4 minuti a 94°C e all'ultimo è seguito uno step di estensione finale di 5 minuti a 72°C.

2.3. Amplificazione dei geni PRKAG3 e RYR1

Gli accession number per le sequenze genetiche usate per lo studio in silico sono: GeneBank M91456, M91451 e AF214521 per il gene RYR1 e PRKAG3 rispettivamente. Per l'allineamento multiplo è stato utilizzato il software ClustalW (Thompson *et al.* 1994), mentre per lo studio del profilo di melting il software Winmelt 2.0.13 (Bio-Rad). Per amplificare il frammento di 85 bp comprendente il nucleotide 1843 del gene per il RYR1 suino sono stati utilizzati i primer MH1 (5'-GCTGGATGTCCTGTGTTCCCT-3') e MH2 (5'-CAGGGAGCAAGTTCTCAGTAATGAG-3'). Mentre, per amplificare il frammento di 97 bp comprendente il nucleotide 595 (per la mutazione V199A) ed il nucleotide 599 (per la mutazione R200Q) per il gene PRKAG3 suino, sono stati utilizzati i primer PRK1 (5'-CTCCGGCGCTCAGATCAAG-3') e PRK2 (5'-CACCCACGAAGCTCTGCTTCT-3').

Per amplificare unicamente 650 bp del frammento per RYR1 contenente la mutazione d'interesse sono state utilizzate le condizioni, le concentrazioni e i primer sviluppati da Fujii *et al.* (1998). Tale amplificato è stato utilizzato per la RFLP allo scopo di individuare gli omozigoti o eterozigoti per la mutazione C1843T.

Allo scopo di verificare le amplificazioni e di mettere a punto la PCR multiplex sono state adottate da principio alcune condizioni di amplificazione senza BSA e LCGreen I. Le amplificazioni sono state eseguite su termociclatori Mastercycler (Eppendorf, Germania) e

PTC-200 MJ thermocycler (MJ Research, USA) in 25 μ l di volume contenete 0,2 mM di dNTP, 1X buffer di reazione (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1 U di Promega Taq polimerasi (Promega, Italy), e 0.2 μ M di ogni primer. Le condizioni di amplificazione per i primer Csn1/Csn2 usati per l'analisi del profilo di melting consiste in 30 cicli, 30 secondi a 94°C, 30 secondi di appaiamento a 60°C ed estensione per 30 secondi a 72°C. Il primo ciclo è preceduto da uno step di denaturazione iniziale per 3 minuti a 94°C e all'ultimo è seguito uno step di estensione finale di 5 minuti a 72°C.

Per utilizzare l'amplificato nell'analisi di melting con l'HR-1 è necessario aggiungere nella mix di reazione di amplificazione i relativi componenti (LCGreen I e BSA) alle concentrazioni di 1X. Ciò avviene in contrario a quanto detto prima per l'analisi di melting denaturante in Real Time dato che allora aggiungevamo il Syber Green con in denaturante solo dopo la reazione di amplificazione, in quanto la composizione della miscela denaturante non permette la funzionalità della DNA polimerasi nella reazione. La BSA (Albumina di Siero Bovino) è indispensabile per l'analisi di melting nel capillare dell'HR-1, in quanto altrimenti entrerebbero in gioco fenomeni di adsorbimento superficiale dei frammenti di amplificato verso la parete interna del capillare composto da borosilicati, impedendo perciò una corretta denaturazione termica e visualizzazione. Il LCGreen I, come precedentemente specificato è necessario come fluoroforo saturante e svolge la propria funzione intercalandosi nel double strand di DNA.

2.4. Elettroforesi in gel d agarosio

I gel di agarosio utilizzati sono alle percentuali di 1,5%, 2% o 2,5% a seconda della grandezza degli amplificati in questione in 0,5% di TBE. Naturalmente più l'amplificato è piccolo maggiore sarà la concentrazione di agarosio in modo da avere una migliore risoluzione delle bande. La colorazione è stata eseguita con bromuro di etidio alla concentrazione di 0.5 µg/ml.

2.5. RFLP

Allo scopo di individuare gli omozigoti o eterozigoti per la mutazione C1843T, il DNA estratto dai campioni di cute di maiale sono stati sottoposti all'analisi RFLP (Restrizione per i Polimorfismi di Lunghezza dei Frammenti), utilizzando 8 µl di amplificato con frammenti di lunghezza di 650 bp amplificati con le condizioni Fujii *et al* (1991). Naturalmente in questo caso non si sarà utilizzato LCGreen I e la BSA per l'amplificazione. L'amplificato viene digerito per 3 ore a 65°C con 2 U di BsiHKAI (NewEngland Biolabs, USA) e inattivata per 20 minuti a 85°C secondo le specifiche del produttore. La reazione di restrizione viene successivamente visualizzata sul gel d'agarosio al 2,5% con 0,5% di TBE buffer e colorato con una soluzione contenente 0,5 µg/ml di etidio bromuro.

2.6. DNA Melting Analysis

Quattordici microlitri della PCR multiplex sono stati caricati nei capillari per il LightCycler (Roche Diagnostics, USA) con 5 µl di olio minerale. Questo per impedire una eventuale evaporazione del contenuto, altrimenti i risultati ottenuti non sarebbero sufficientemente affidabili, dato che la concentrazione dei soluti varierebbe insieme alla fluorescenza. I campioni vengono fatti correre nel DNA melter HR-1 (Idaho Technology, USA) con una rampa di 0,25°C/sec ed un intervallo di 65-94°C. La fluorescenza risultante viene analizzata con l'apposito software Data Analysis e Origin (OriginLab, USA) per l'analisi dei dati.

Il tempo necessario per l'analisi con questa metodica per ogni campione è di circa 2 minuti post PCR, quindi molto veloce con la visualizzazione in tempo reale dell'analisi.

2.7. Denaturant DNA Melting Analysis

Per l'analisi della κ -caseina utilizzando la soluzione denaturante sviluppata è stato utilizzato un volume pari a 25 µl contenente 3,75 µl di etanolo 70%, 5 µl di glicerolo 50%, 5 µl Sybr Green I, 6,25 µl di TAE 1X e 5 µl di DNA ed analizzato con il programma di denaturazione da 60°C a 95°C.

2.8. Sequenziamento

Per il sequenziamento degli amplificati ci si è avvalso del .BMR (Università degli Studi di Padova, Italia), tramite il quale è stato possibile ottenere i dati nucleotidici.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente studio è stato possibile approfondire e sviluppare nuove metodiche per la discriminazione di varianti alleliche e SNPs particolarmente importanti per i prodotti di origine animali, qui sono trattati principalmente prodotti derivati dal latte bovino e dalla carne suina. L'importanza di tale studio non può infatti prescindere dal fatto che la qualità di questi prodotti è legata alla genetica dell'animale da cui essi derivano. Di basilare importanza restano tutti i processi tecnologici alla base del prodotto stesso che ne determinano la tipologia di prodotto e la qualità, ma a parità di questi, le caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche del derivato sono fondamentali sia per indirizzarlo ad una determinata lavorazione, sia per determinarne le caratteristiche organolettiche che per stimare la possibile produzione.

3.1. Il gene CSN3

La k-caseina svolge un ruolo chiave nella caseificazione determinandone la resa in formaggio e le caratteristiche della cagliata, per questo motivo, considerando l'impatto di una metodica rapida ed economica, potrebbe avere nell'industria casearia ma anche di supporto per i progetti di breeding, è stato deciso di sviluppare una nuova metodologia innovativa basata sui principi della DNA melting analysis, ma in questo caso in soluzione denaturante, da cui il nome di denaturante DNA melting analysis. Il metodo di estrazione utilizzato permette di estrarre il DNA da

cellule eucariote presenti nel latte crudo senza l'impiego di reagenti tossici e, eliminando i passaggi enzimatici, diminuendo i tempi di estrazione. Questo sistema di estrazione prende i vantaggi delle migliore solubilità della α e β -caseina in soluzione contenente una bassa concentrazione di ioni bivalenti, ottenuta aggiungendo un alta concentrazione di una agente chelante il Ca^{2+} alla sospensione naturale del latte crudo. Quindi, utilizzando un alta concentrazione di EDTA è possibile eliminare la maggior parte delle proteine e più facilmente ottenere le cellule somatiche. La solubilità aumentata delle α e β -caseine in basse concentrazioni di ioni bivalenti è presumibilmente correlate alla sottrazione di ioni Ca^{2+} , la quale causa una modificazione dell equilibrio micellare (Ribadeau *et al.* 1991, Udabage *et al.* 2001).

La composizione GC dei frammenti di 165 bp derivati dall amplificazione dell esone IV del gene CSN3 bovino è pari a 44,85% e 45,45% per l allele A e B rispettivamente, mentre la percentuale di identità è pari a 97,58% (Tab. 7).

Identity (%)	A	B	E	F	G	H	I
A	-	97.58	99.39	100	99.39	99.39	100
B	97.58	-	96.97	97.58	96.97	96.97	97.58
E	99.39	96.97	-	99.39	98.79	98.79	99.39
F	100	97.58	99.39	-	99.39	99.39	100
G	99.39	96.97	98.79	99.39	-	100	99.39
H	99.39	96.97	98.79	99.39	100	-	99.39
I	100	97.58	99.39	100	99.39	99.39	-
%GC	44.85	45.45	45.45	44.85	44.24	44.24	44.85

Tabella 7. Percentuali di identità e %GC nell'amplificato di 165 bp della k-caseina IV esone con in primer Csn1/Csn2.

La amplificazione Csn1/Csn2 dell allele B differisce dall allele A per quattro polimorfismi nucleotidici nella posizione 32 (Ile₁₃₆ invece di Thr₁₃₆), 68 (Ala₁₄₈ invece di Asp₁₄₈), 129 (mutazione silente) e 137 (non-regione non codificante) dei loro frammenti amplificati (Fig. 1).

Nel presente studio, la miscela denaturante è stata utilizzata per la messa a punto del sistema, utilizzando una Real Time PCR. Quest'ultima non è particolarmente utilizzata per analisi di melting, in quanto la sua scarsa sensibilità e velocità non la rendono ideale per lo studio, ma utilizzando la miscela di denaturazione, è stato possibile incrementare la risoluzione e discriminare le varianti alleliche (Fig. 3).

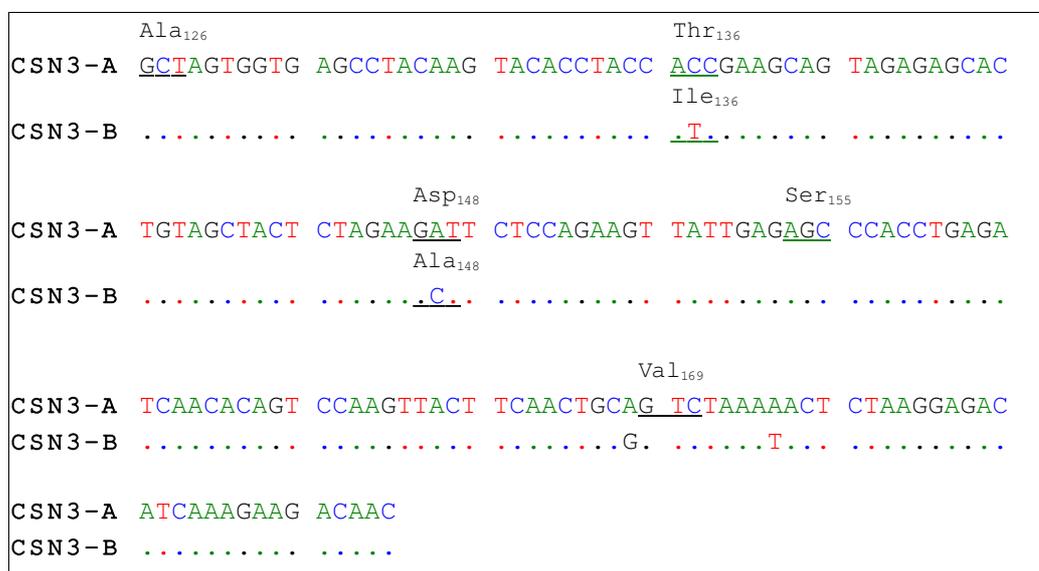


Figura 1. Frammento di 165bp amplificato dai geni Csn1/Csn2 dell'esone IV della k-caseina bovina. Sono indicate la sequenza nucleotidica dell'allele A e B con i relativi accession number.

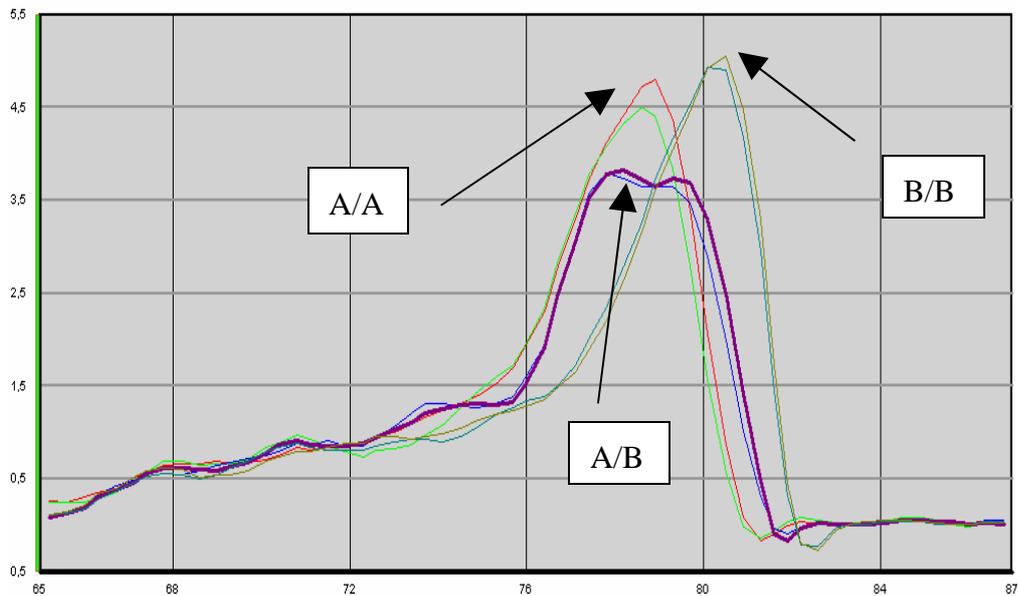


Figura 3. Identificazione allelica del gene per la k-caseina bovina con dDMA. Picchi corrispondenti all'amplificato di 165 bp genotipi A/A, A/B, e B/B.

Per la messa a punto della miscela sono state sperimentati molte variabili e componenti i cui principali sono sintetizzati nella Tabella 8.

Il risultato è un netto miglioramento delle capacità di discriminazione allelica della macchina, tale da permettere con sicurezza di discriminare le varianti in soltanto 20 minuti circa post PCR per un massimo di 96 campioni in un totale, estrazione inclusa di circa 3 ore e 30 minuti. Sono stati perciò analizzati n°13 campioni a genotipo noto, confermando la metodica sviluppata.

Soluzione	Range
Etanolo abs.	0% - 28%
Syber Green I	10% - 60%
TAE 5X	0% - 8%
Glicerolo 50%	0% - 40%
Urea 1M	0% - 10%
TBE 1X	0% - 8%
Magnesio 25mM	0% - 10%
BSA 1X	0% - 5%

Tabella 8. Sintesi dei reagenti testati per lo sviluppo della soluzione di denaturazione in denaturant DNA Melting Analysis.

3.2. I geni RYR1 e PRKAG3

La stessa importanza che riveste la possibilità di poter discriminare l'allele A o B della k-caseina, la riveste la possibilità di poter discriminare mutazioni puntiformi all'interno di specifici geni che determinano la qualità della carne di suino. Come nell'introduzione è stato precedentemente spiegato i geni RYR1 e PRKAG3 rivestono un ruolo chiave nell'industria della carne, in quanto direttamente responsabili di caratteristiche organolettiche e chimico-fisiche della carne inoltre, se non correttamente selezionati, questi caratteri possono perdurare in eterozigosi anche in eventuali verri e scrofe, con il conseguente risultato che il prodotto della figliata potrebbe non essere in gran parte trasformabile e quindi grave perdita economica. La necessità di affiancare all'allevatore la possibilità di poter selezionare i propri riproduttori o

anche gli stessi maiali da macellare per poter differenziare la produzione, è quindi impellente e vivamente sentita dal comparto produttivo. Per tali motivi è stato deciso di sviluppare un nuovo protocollo di analisi che potesse individuare contemporaneamente gli alleli di due geni implicati nella qualità della carne, utilizzando, in collaborazione con la Idaho Technology (USA), una macchina appositamente sviluppata per la DNA melting analysis.

Per lo scopo dello studio sono stati utilizzati campioni di cute provenienti da allevamenti locali situati in Baviera, Austria e Sudtirolo, considerato che l'industria della carne di maiale in queste località riveste un'importante attività grazie alle numerose varietà di prodotti tipici. Inoltre, i prodotti derivati dalla carne dovrebbero avere specifici aromi, gusto e proprietà tecnologiche costanti, in modo da garantire la standardizzazione dei prodotti finiti. L'identificazione genetica di specifici alleli possono essere di aiuto per incrementare il valore aggiunto del prodotto ed evitare eventuali perdite economiche dovuto alla non idoneità della carne alla trasformazione.

Un nuovo protocollo basato sull'utilizzo della DNA melting analysis ad alta risoluzione è stato sviluppato in collaborazione con la Idaho Technology (USA), la quale ha fornito la strumentazione necessaria per l'analisi, l'HR-1. Il protocollo sviluppato permette la contemporanea identificazione della mutazione del gene RYR1 (C1843T) (Fig. 4a) e gli alleli del gene PRKAG3: I, V, RN⁻, RN causati da specifiche mutazioni, A595G, G599A (Fig. 4b), rispettivamente, in un tempo molto breve.

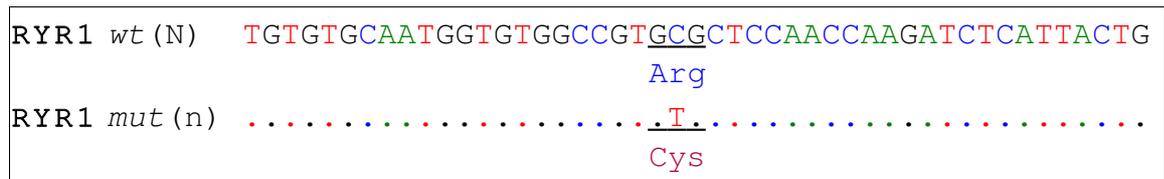


Figura 4a. Allineamento di un tratto del gene RYR1. Sono evidenziate le sostituzioni C1843T con i corrispettivi amminoacidi.

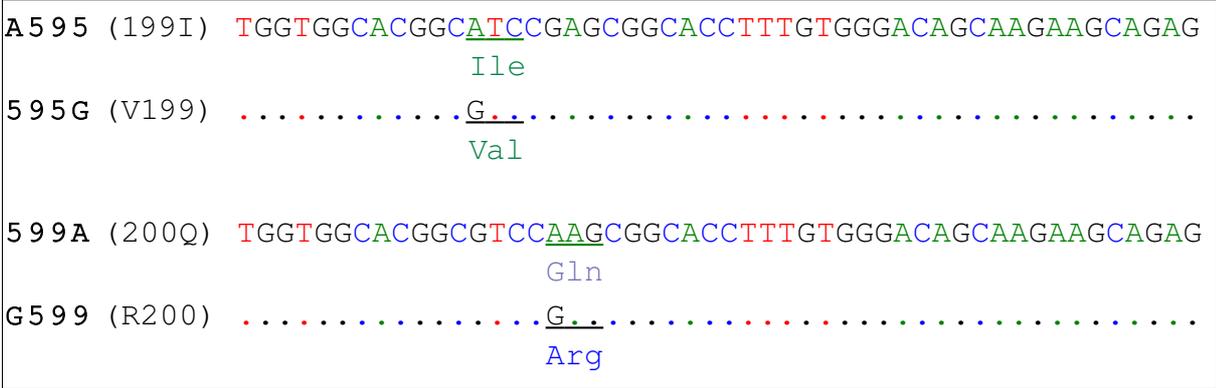


Fig. 4b. Allineamento di un tratto del gene PRKAG3. Sono evidenziate le sostituzioni A595G e G599A con i corrispettivi amminoacidi.

Due frammenti molto piccoli di 85bp e 97 bp per il gene RYR1 e PRKAG3 sono stati amplificati in multiplex allo scopo di distinguere gli omozigoti ed eterozigoti per ogni gene. Durante l'analisi l'HR-1 rileva le minime diminuzioni o aumenti di fluorescenza dovuti alla dissociazione del fluoroforo LCGreen I dovuta al melting dell'amplificato causato dall'aumento progressivo della temperatura (Herrmann *et al.* 2006).

Tre sequenze standard per ogni gene con sostituzioni differenti sono state amplificate con i primer MH1/MH2 e PRK1/PRK2 e sottoposte a sequenziamento per confermare la loro composizione. Confrontando il profilo e la ΔT_m ottenuta è possibile discriminare gli eterozigoti dagli

omozigoti. Tre sequenze standard (una per ogni sostituzione) è coamplificata nella stessa sessione di amplificazione insieme ai campioni, questo perché seppur minime, le variazioni di concentrazione o di amplificazione da un amplificato ad un altro possono contribuire all'interpretazione erronea dei risultati. La differenza di 12 bp tra gli ampliconi di PRKAG3 e RYR1, permette di discriminare i genotipi dei due differenti geni contemporaneamente dato che i picchi di fluorescenza relativi sono distinti nella rampa di temperatura (84°C-87.5°C per RYR1, 87.5°C-90.5°C per PRKAG3) (Fig. 5).

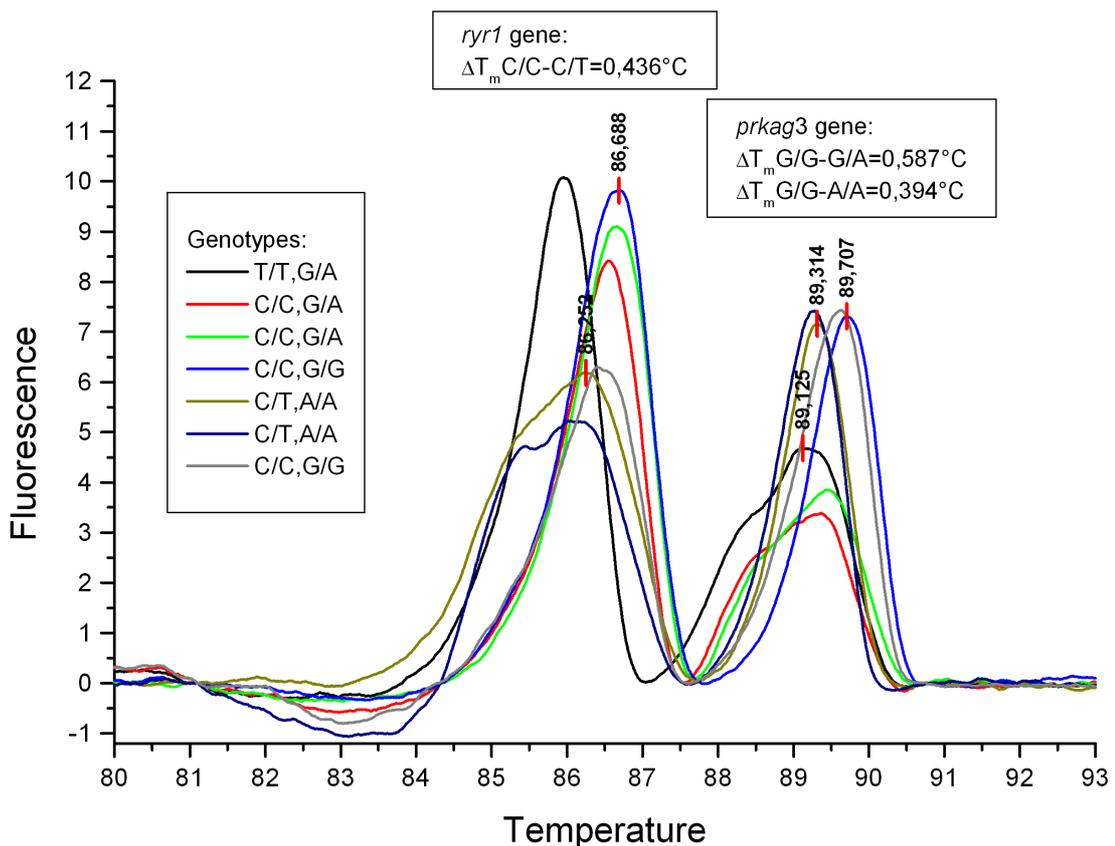


Figura 5. Grafico ottenuto tramite l'analisi di melting con l'HR-1. Sono riportati le sostituzioni nucleotidiche dei relativi geni amplificati in multiplex.

Per verificare i risultati, sequenziamenti casuali hanno evidenziato la congruenza dei risultati, inoltre tutti i campioni per RYR1 sono stati sottoposti a RFLP secondo un protocollo ben consolidato che ha ulteriormente confermato i risultati (Fig. 6).

Per le sostituzioni V199I (A595G), R200Q (G599A) 48 su 100 campioni sono stati analizzati con l'HR-1, inoltre 21 campioni sono stati sequenziati per i geni RYR1 e PRKAG3 confermando il genotipo identificato (Fig. 4).

E' interessante notare che su 100 campioni analizzati per RYR1 l'allele n non sia ancora stato completamente eliminato, nonostante sia stato un carattere duramente controsclezionato, ma perduri per il 13% in eterozigosi e per 1% in omozigosi, mentre l'allele N è presente per il 86% in omozigosi (Tab. 9) .

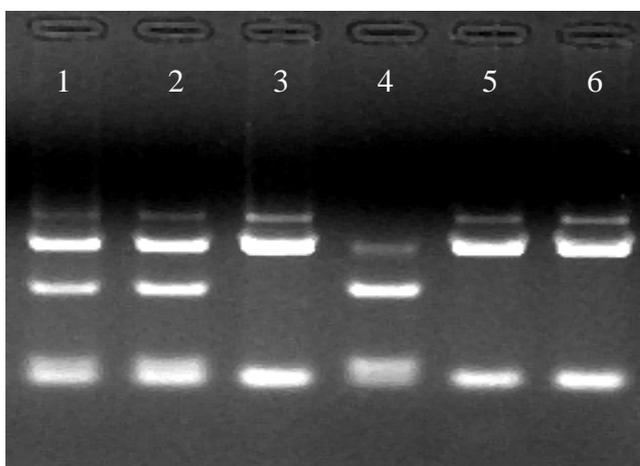


Figura 6. Analisi di restrizione ottenuta tramite l'enzima BsiHKA I. Lane 1, 2, eterozigoti N/n; 3, 5, 6, omozigoti N/N; 4, omozigote n/n.

Tutti i 48 campioni analizzati per PRKAG3 sono risultati omozigoti per la sostituzione R200, confermando l'ipotesi che una sua sostituzione (200Q) sia razza specifica Milan *et al.* (2000). Le frequenze genetiche per la sostituzione V199I sono di 0,17, 0,54 e 0,29 per i genotipi I/I, I/V e V/V rispettivamente. Si può notare che nonostante i campioni provengano da un'area dove l'industria del maiale sia fortemente caratterizzante, solo 4 campioni avevano gli aplotipi più favorevoli (N/N, I/I) e solamente 2 erano riproduttori (Tab. 9). I geni RYR1 e PRKAG3 possono quindi essere simultaneamente discriminati e i loro genotipi identificati in base alla loro T_m e profilo di melting per mezzo dell'HR-1. Le frequenze genotipiche ricavate indicano che l'allele N e I potrebbero essere incrementate nei programmi di selezione portando a una notevole aumento qualitativo dei prodotti derivanti.

Gene	Genotype	Frequency	Observed frequencies
RYR1			
C1843T	N/N	0,86	p=0.925
	N/n	0,13	
	n/n	0,01	q=0.075
pigs		100	
PRKAG3			
G595A	II	0,17	p=0.4375
	IV	0,54	
	VV	0,29	q=0.5625
A599G	RR	1,00	
	RQ	0,00	

Tabella 9. Frequenze genotipiche per le sostituzioni nei geni RYR1 e PRKAG3.

Successivamente gli stessi principi della DNA melting denaturante sono stati applicati anche per l'analisi del profilo di melting con l'HR-1 per i geni RYR1 e PRKAG3, allo scopo di migliorarne la sensibilità.

E' stata sviluppata una soluzione denaturante con differenti concentrazioni dei reagenti allo scopo di adattare la composizione sia al differente fluoroforo, che per ottimizzarla all'uso con l'HR-1.

Nella tabella 10 sono riportate le differenze, in merito alla T_m sia per quanto riguarda i genotipi analizzati senza denaturante che con denaturante.

Gene	Sostituzione	Genotipo	ΔT_m senza denat.	ΔT_m con denat.		
RYR1	C/C	N/N	0,436°C	0,750°C		
	C/T	N/n				
PRKAG3	G/A	I/V	0,587°C	0,426°C		
	G/G	I/I			0,394°C	0,952°C
	A/A	V/V				

Tabella 10. Differenziale delle T_m per l'analisi di melting con HR-1 dei geni RYR1 e PRAG3.

Come si può notare, anche attraverso le figure 5 e 7 per quanto riguarda la sostituzione per il gene RYR1, la ΔT_m tra le sostituzioni con i nucleotidi C e T (C1895T) è di 0,435°C senza la soluzione denaturante, mentre di 0,750°C con la soluzione denaturante, ovvero un incremento della ΔT_m del 72,4% per la discriminazione tra omozigote dominante (N/N) ed eterozigote (N/n). Per la sostituzione del gene PRKAG3 (A595G), abbiamo un decremento della ΔT_m da 0,587°C a 0,426°C con un decremento del 27,4% tra omozigote A595 (I/I) ed eterozigote A595/595G (I/V), mentre un incremento della ΔT_m da 0,394°C a 0,952°C tra omozigote A595 (I/I) ed omozigote 595G (V/V) pari al 141,6%. Non è stato possibile calcolare l'incremento/decremento della ΔT_m con o senza denaturante, in quanto l'unico campione omozigote recessivo per il gene RYR1 (n/n) non è stato più disponibile.

Nonostante ciò è possibile affermare con i dati ottenuti che la soluzione denaturante sviluppata per l'HR-1 svolge una interessante azione sull'amplificato tale da permettere una maggiore ΔT_m tra omozigoti ed eterozigoti e considerando anche la soluzione di denaturazione applicata alla Real Time PCR per l'identificazione allelica della k-caseina, si può affermare che il *modus operandi* che prevede l'utilizzo di un buffer in grado di influenzare la cinetica di melting dell'amplificato in modo da ottimizzarne la sua identificazione può essere considerato un buon approccio se consideriamo che potrebbero essere coinvolte anche zone dell'amplificato con STR o con %GC elevata, quindi di difficile discriminazione.

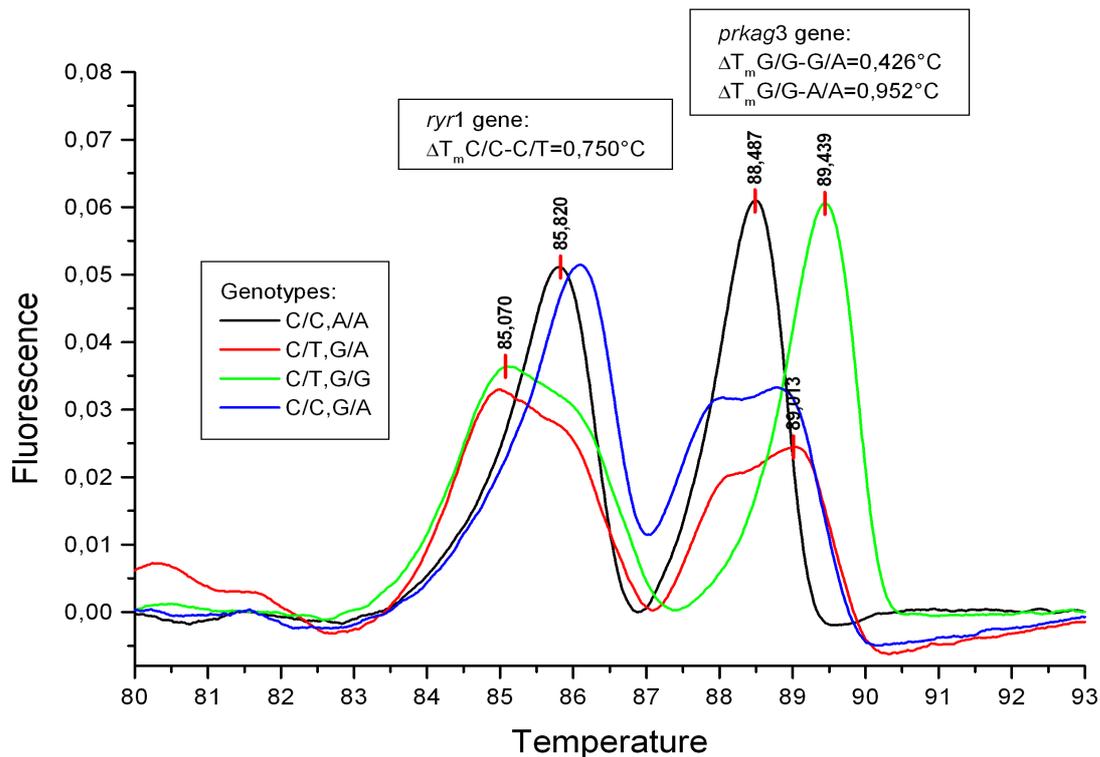


Figura 7. Grafico ottenuto tramite l'analisi di melting con l'HR-1 utilizzando la soluzione denaturante. Sono riportati le sostituzioni nucleotidiche dei relativi geni amplificati in multiplex.

La metodica utilizzata dell'analisi del melting del DNA, anche senza denaturante, tramite HR-1 può essere considerata una buona metodica di discriminazione tra omozigoti ed eterozigoti per una particolare sostituzione nucleotidica, delezione o inserzione in uno o più amplificati contemporaneamente. Inoltre, considerando che non è necessario avere conoscenze in merito alle presunte sostituzione, la metodica è particolarmente indicata anche per la ricerca di SNPs di cui non si hanno dati. Sicuramente le informazioni ottenibili sono molto limitate ed è necessario affiancare eventualmente un sequenziatore, ma la velocità,

economicità e sensibilità della tecnica la rendono un candidato ideale per gli scopi che prevedono l'identificazione anche per un solo nucleotide di omozigoti ed eterozigoti o per la genotipizzazione di determinati ceppi batterici sia patogeni che non. In quest'ultimo caso potrebbe sostituirsi alla PFGE assai più lunga e laboriosa prendendo in esame un pool di specifici amplificati.

Con la presente tesi si pone l'accento di come le metodiche di biologia molecolare possano contribuire all'identificazione di genotipi coinvolti nella qualità dei prodotti animali dando un contributo originale ed innovativo a quelle ad oggi presenti.

4. BIBLIOGRAFIA

Allison C.P., Johnson R.C., Doumit M.E. The effects of HALothane sensitivity on carcass composition and meat quality in *HAL-1843*-normal pigs. /2005) *J. Anim. Sci.* 83: 671-678.

Andersson L. Identification and characterization of AMPK gamma 3 mutations in the pig. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* 31: 232-235.

Barroso A., Dunner S., Canon J., Detection of bovine Kappa-Casein variants A, B, C, and E by means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76 (1998) 1535-1538.

Carr C.C., Morgan J.B., Berg E.P., Carter S.D., Ray F.K. Growth performance, carcass composition, quality, and enhancement treatment of fresh pork identified through deoxyribonucleic acid marker-assisted selection for the Rendement Napole gene. (2006) *J. Anim. Sci.* 84: 910-917.

Chessa S., Chiatti F., Ceriotti G., Caroli A., Consolandi C., Pagnacco G., Castiglioni B., Development of a single nucleotide polymorphism genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms, *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 451-464.

Cheung P.C., Salt I.P., Davies S.P., Hardie D.G., Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. (2000) *Biochem. J.* 346: 659-669.

Ciobanu D., Bastiaansen J., Malek M., Helm J., Woollard J., Plastow G., Rothschild M. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated γ 3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. (2001) *Genetics* 159: 1151–1162.

Enfält A., Lundström K., Hansson I., Johansen S., Nyström P. Comparison of non-carriers and heterozygous carriers of the RN⁻ allele for carcass composition, muscle distribution and technological meat quality in Hampshire-sired pigs. (1997) *Livest. Prod. Sci.* 47: 221-229.

Fàbrega E., Mantecca X., Font J., Gispert M., Carriòn D., Velarde A., Ruiz-de-la-Torre J.L., Destre A. Effects of HALothane gene and pre-slaughter treatment on meat quality and welfare from two pig crosses. (2002) *Meat Sci.* 62: 463-472.

Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E.,

Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F., Swaisgood H.E., Nomenclature of the proteins of cows' milk-Sixth revision, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 1641-1674.

Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., MacLennan D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. (1991) *Science* 253: 448-451

Medrano J.F., Aguilar-Cordova E., Genotyping of bovine κ -casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology* 8 (1990) 144-146.

Milan D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Iannuccelli N., Rask L., Ronne H., Lundstrom K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Roy P.L., Chardon P., Andersson L. A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. (2000) *Science* 288: 1248-1251.

Otsu K., Nishida K., Kimura Y., Kuzuya T., Hori M., Kamada T., Tada M. The point mutation Arg615Cys in the Ca²⁺ release channel of skeletal sarcoplasmic reticulum is responsible for hypersensitivity of caffeine and HALothane in malignant hyperthermia. *J. Biol. Chem.* (1994) 269:9413-9415.

Prinzenberg E.M., Krause I., Erhardt G., SSCP analysis at the bovine

CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). *Anim. Biotechnol.* 10 (1999) 49-62.

Rahali V., Menard J.L., Influence of genetic variants of β -lactoglobulin and κ -casein on milk composition and cheesemaking properties. *Lait* 71 (1991) 275-297.

Ribadeau B., Grappin R., Milk protein analysis. *Lait* 69 (1989) 357-416.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Schaar J., Hansson B., Pettersson H.E., Effects of genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin on cheese making. *J. Dairy Res.* 52 (1985) 429-437.

Soria L.A., Iglesias G.M., Huguet M.J., Mirande S.L., A PCR-RFLP test to detect allelic variants of the bovine kappa-casein gene. *Anim. Biotechnol.* 14 (2003) 1-5.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680.

Udabage P., McKinnon I.R., Augustin M.A., Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. *J. Dairy Sci.* 84 (2001) 1569-1575.

Van Eenennaam A., Medrano J.F., Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 1730-1742.