

Cosa c'è nel polpettone? Identificazione della specie carnea



SCOPO DELL'ATTIVITÀ

L'analisi di un gene mitocondriale, il citocromo b, consente di identificare la specie carnea di campioni aventi una dubbia origine. Il gene è molto variabile tra specie e specie, ma estremamente conservato a livello intraspecifico: amplificando tramite PCR una determinata sequenza interna al gene, si ottengono frammenti specie-specifici di diversa lunghezza che, analizzati mediante elettroforesi, individuano il tipo di carne (equina, bovina, ovina...).

PREREQUISITI

- Struttura del DNA
- La PCR
- L'elettroforesi del DNA

INTRODUZIONE

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

In questi casi per identificare la specie a cui appartiene la carne macinata si deve ricorrere al test del DNA. Con la PCR viene amplificata una parte del citocromo b, un gene mitocondriale: si utilizza un primer forward (5'-CCT CCC AGC TCC ATC AAA CAT CTC ATC TTG ATG AAA-3') comune a tutte le specie carnee mentre come reverse primer viene utilizzato un oligonucleotide specie-specifico (vedi tabella). I prodotti della PCR sono quindi di lunghezza tipica della specie a cui appartiene il campione analizzato.

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

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

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

SCHEMA DELL'ESPERIMENTO

Agli studenti vengono fornite provette eppendorf numerate da 1 a 5 contenenti campioni di DNA provenienti da diverse specie carnee:

1 = capra

2= pollo

3= bovino

4= maiale

5 = cavallo

La provetta n° 6 contiene il DNA estratto da un composto di carne macinata di dubbia composizione

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Preparazione del gel di agarosio

Nota di laboratorio: la concentrazione di agarosio del gel viene scelta dal ricercatore in base alle dimensioni dei frammenti di DNA da separare. Nel nostro caso, dovendo separare frammenti lineari di DNA compresi tra 100 e 2.000 bp, si utilizza un gel di agarosio al 2%.

Preparazione del gel

- preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di nastro adesivo di carta
- verificare che il piano su cui si appoggia la vaschetta per elettroforesi sia a bolla
- misurare 30 ml di tampone TBE 1x in un cilindro e versarli nella beuta di vetro pirex che contiene già 0,6 gr di agarosio. Attenzione a non rovesciare la beuta.
- pesare la beuta contenente la soluzione di agarosio e segnare il peso sul protocollo: _____
- sciogliere l'agarosio nel forno a microonde impostato sulla potenza indicata da una figura con tre fiammelle (circa 500V) per 1 minuto. Aprire poi il forno a microonde, agitare delicatamente la soluzione con una presina, facendo attenzione a non scottarsi. Richiudere il forno a microonde e sciogliere la soluzione per un ulteriore minuto alla stessa potenza
- pesare la soluzione di agarosio (l'acqua del tampone, bollendo, è evaporata!) e riportare la soluzione di agarosio al peso originale, utilizzando una spruzzetta con H₂O distillata. Attenzione: far cadere l'acqua delicatamente, facendola scivolare lungo i bordi della beuta, altrimenti si formano delle bolle
- aspettare 3-5 minuti, coprendo la beuta contenente la soluzione di agarosio con un pezzetto di stagnola, per evitare l'evaporazione. L'agarosio deve raggiungere una temperatura intorno ai 60°C, altrimenti rovina il supporto di plastica della vaschetta dell'elettroforesi. Quindi versare la soluzione di agarosio, evitando di formare bolle, nella vaschetta per elettroforesi dove è già stato inserito il pettine. I pozzetti si formano quando, una volta solidificato il gel, viene tolto il pettine

- lasciare solidificare a temperatura ambiente per circa 15 min. Quando è solidificato, il gel diventa opaco
- mentre si aspetta che il gel solidifica, fare delle prove di caricamento dei pozzetti del gel (12µl di loading dye 1x) su altri gel già pronti
- togliere il nastro di carta dalla vaschetta e metterla nella cella
- togliere lentamente il pettine, tenendosi perpendicolare rispetto al gel

Corsa elettroforetica

- aggiungere 2 µl di loading dye 6x ai 10 µl di ciascun campione di DNA e risospendere con la micropipetta, evitando di formare bolle. Il glicerolo presente nel loading dye serve per rendere più densa la soluzione di DNA da caricare nel pozzetto e quindi a facilitarne l'entrata nel pozzetto
 - se si formano bolle, centrifugare brevemente (1 sec) in una microcentrifuga eppendorf (in gergo di laboratorio, si dice "spinnare" da spin, centrifugare)
 - caricare lentamente ciascun campione (12 µl) nei singoli pozzetti (ogni pozzetto ha un volume di circa 15 µl), ponendosi con la punta della micropipetta in un angolo del pozzetto e perpendicolare rispetto al gel, facendo attenzione a non bucare il fondo del pozzetto stesso e a non far uscire il campione fuori dal pozzetto
 - in un pozzetto laterale, caricare il marker di DNA a peso molecolare noto
 - chiudere il coperchio della cella elettroforetica
 - collegare i morsetti alla camera di corsa e ai poli del generatore di corrente, detto anche power supply; il DNA è carico negativamente e migra verso il polo positivo
 - fissare il voltaggio al valore costante di 100 V e lasciare procedere la corsa elettroforetica per circa 30 min
 - fare attenzione che la banda del blu di bromofenolo non esca dal gel (altrimenti alcune bande di DNA possono uscire dal gel)
 - osservare la migrazione del loading dye per valutare la migrazione del DNA, che, essendo incolore, non si può vedere. Il blu di bromofenolo migra alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300 bp, mentre lo xilen cianolo migra alla stessa velocità di un frammento di circa 4.000 bp. Attenzione: fermare la corsa elettroforetica quando il blu di bromofenolo si trova a circa 1-2 cm dalla fine del gel, in modo da evitare che il DNA esca dal gel stesso. Se dovesse succedere, si perdono i campioni di DNA!
- Operazioni da svolgere alla fine della corsa elettroforetica. Questa operazione viene svolta dal tutor:
- al termine della corsa, indossare i guanti monouso, togliere delicatamente il gel dalla cella
 - osservare il gel al transilluminatore
 - pulire le apparecchiature ed il banco di lavoro con acqua ed etanolo denaturato
 - dopo aver finito di lavorare, lavarsi le mani