

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE  
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA  
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE  
VETERINARIE E ZOOTECNICHE

ATTI DELLA 2<sup>a</sup> CONFERENZA NAZIONALE SU:

# STATO DELL'ARTE DELLE RICERCHE ITALIANE NEL SETTORE DELLE BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE VETERINARIE E ZOOTECNICHE

a cura di: Giorgio Poli, Gianfranco Panina, Mara Rocchi, Luigi Bonizzi, Paola Dall'Ara

Università di Milano. 22 Aprile 1994

EDITO A CURA DELLA  
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE

I. CAPPUCCIO, A. VALENTINI, M. BAGLIACCA\*

## FONTI ALTERNATIVE DI DNA PER EVIDENZIARE POLIMORFISMI RAPD IN SPECIE DI INTERESSE ZOOTECONICO

Università della Tuscia, Istituto di Zootecnia, Viterbo e  
\*Università di Pisa, Dip. Scienze Anat., Fisiol. e Prod. Anim., Pisa

### RIASSUNTO

I polimorfismi del DNA possono essere messi in evidenza con diverse tecniche, quali RFLP, VNTR, PCR di geni polimorfici, sequenziamento ecc. Recentemente è stata messa a punto una tecnica molto rapida per l'analisi dei polimorfismi chiamata RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), che è stata utilizzata da diversi Autori per stimare distanze genetiche, filogenesi e variabilità genetiche in numerosi organismi. La tecnica si basa sulla amplificazione con PCR di DNA genomico utilizzando come *primer* un singolo nucleotide di 10 basi. Poiché l'*annealing* del *primer* avviene a bassa stringenza, particolare cura deve essere posta nella messa a punto delle condizioni sperimentali che diano risultati riproducibili. Ad oggi la tecnica è stata utilizzata negli animali di interesse zootecnico su DNA ottenuto da linfociti di sangue periferico. È interessante poter applicare la tecnica RAPD a specie e popolazioni di diverse provenienze, ma spesso risulta difficoltoso spedire sangue o cellule nucleate al centro di analisi, quando non sia possibile effettuare l'estrazione di DNA sul posto. Abbiamo voluto allora provare diverse fonti di DNA, facilmente trasportabili, che dessero con la tecnica RAPD le stesse risposte ottenute con DNA estratto con i procedimenti classici. Abbiamo utilizzato unghioni e pelo per bovini e penne per fagiani. Le condizioni sperimentali che hanno consentito di massimizzare la ripetibilità dei profili RAPD sono state una polverizzazione fine dei materiali con azoto liquido e digestione con Proteinasi K a temperatura di 56°C limitata nel tempo. In questo modo i profili RAPD sono risultati indipendenti dalla fonte di DNA impiegata almeno per le bande di maggiore intensità.

*Parole chiave:* DNA - RAPD - estrazione - polimorfismo.

## ALTERNATIVE DNA SOURCES TO DETECT RAPD POLYMORPHISMS IN SPECIES FOR ANIMAL PRODUCTION

### SUMMARY

The DNA's polymorphism can be detected by different techniques as RFLP, VNTR, PCR of specific genes, DNA sequencing and others. Recently a fast technique has

been introduced to reveal polymorphisms called RAPD (random amplified polymorphic DNA). Many researchers have employed this technique to determine genetic distances and variability in several species or for phylogenetic studies.

The technique is based on PCR amplification of genomic DNA, using a single random 10-mer primer. The assessment of the experimental parameters is of primary importance to obtain reproducible results. Actually the mammalian genomic DNA used as template in the PCR is extracted from periferic blood lymphocytes. The possibility to apply the RAPD technique to worldwide populations can be limited by problems of expedition of blood or nucleate cells to the analysis centre, when the DNA extraction is not feasible in place. We have experimented the possibility to obtain genomic DNA from different sources, easy to store, but still able to produce the same RAPD results as the DNA obtained by traditional methods. We have used genomic DNA extracted from fingernail and hair of cattle and from feathers of pheasant. The experimental conditions that maximized the repeatability of RAPD analysis were a fine grinding of the materials by liquid nitrogen and a short incubation with K proteinase at 56°C. In this way the RAPD profiles resulted independent from the DNA source at least for the stronger bands.

*Key words:* DNA - RAPD - extraction - polymorphism.

## INTRODUZIONE

L'analisi della variabilità genetica presente nelle popolazioni naturali o sottoposte a selezione è stata condotta in passato sulla base di una valutazione dei caratteri fenotipici presentati dagli individui o delle prestazioni delle loro progenie. L'introduzione dei marcatori molecolari, in grado di rilevare la variabilità presente direttamente a livello del DNA, rappresenta un notevole progresso verso la caratterizzazione del patrimonio genetico. Nei programmi di selezione la possibilità di stabilire il grado di parentela fra gli individui rappresenta un utile parametro per valutare gli effetti della selezione mentre una più accurata analisi del genoma può rappresentare la base per l'individuazione dei soggetti da introdurre in tali programmi. Il metodo più diffuso di caratterizzazione del genoma è quello basato sugli RFLP. Esso utilizza il polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione generati da appropriati enzimi come base per la determinazione della variabilità e per la creazione di mappe genetiche. La carenza di polimorfismo evidenziabile nel caso di individui strettamente imparentati fra loro, quali quelli appartenenti a popolazioni sottoposte a selezione spinta, rende difficoltosa la creazione di tali mappe mediante RFLP. In seguito alla introduzione della PCR (5) sono stati creati dei metodi alternativi per la determinazione molecolare del polimorfismo, tra questi ha incontrato particolare successo la tecnica di analisi basata sull'amplificazione casuale, impiegando *primers* arbitrari, di molteplici frammenti del genoma (RAPD) che venne presentata nel 1990 da Williams *et al.* (9) e Welsh e McClelland (7). Non è richiesta alcuna conoscenza della sequenza del DNA utilizzato come stampo che non deve essere necessariamente purificato ed inoltre le quantità che ne vengono impiegate sono estremamente ridotte. L'ottenimento di risultati immediati facilita notevolmente la programmazione del lavoro. Tuttavia tale tecnica presenta diversi inconvenienti. Numerosi parametri influenzano la reazione di amplificazione, i più

importanti sono la concentrazione del magnesio e le temperature impiegate nei cicli di amplificazione. L'ottimizzazione di tali parametri, effettuata per via sperimentale, risulta talora difficoltosa e non è in grado di assicurare la ripetibilità dei risultati ottenibili con la maggior parte dei *primers*. È preferibile allora scartare i *primers* che non danno risultati affidabili ed usare solo quelli che forniscono lo stesso *pattern* di amplificazione in più prove successive.

Tale tecnica è stata applicata su numerose specie vegetali (*Allium*, *Hordeum*, *Lactuca*, *Medicago*, *Vitis*, *Lycopersicum*, *Solanum*, *Malus*, *Phaseolus*, *Avena*, *Triticum*, *Vicia*, *Brassica* ecc.), animali (*Mus*, *Pan*, *Gallus*, *Hymenoptera*, *Aphis*, ecc.) e microrganismi (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*). Tra le applicazioni di tale tecnica più diffuse vi è la caratterizzazione genotipica (DNA *fingerprinting*). Infatti i profili dei RAPD presentano un polimorfismo utilizzabile per la differenziazione di diverse specie (9), varietà di una medesima specie (8) e addirittura singoli individui (10). Inoltre i RAPD possono essere utilizzati come marcatori molecolari associati a particolari geni (3), per la realizzazione di mappe genetiche (4); e per la localizzazione cromosomica di mutazioni (10). Infine i RAPD sono stati impiegati per analisi di popolazione e di parentela (2) nonché per studi filogenetici.

Nel nostro laboratorio la tecnica dei RAPD è stata impiegata per determinare la variabilità presente in una popolazione di tori di razza Frisona Italiana sottoposti a prova di progenie presso l'ANAFI (Associazione Nazionale Allevatori Razza Frisona Italiana) (6).

In relazione al DNA utilizzato, poiché la tecnica è in grado di amplificarne quantità ridottissime, abbiamo voluto esaminare la possibilità di ricavarlo da fonti alternative al sangue che viene generalmente impiegato nel caso degli animali ma presenta difficoltà di conservazione, di spedizione e trasporto. Fonti di DNA alternative al sangue, quali penne e pelo, sono poi particolarmente utili negli studi sulle popolazioni selvatiche in quanto tali campioni che sono spesso raccolti nell'areale di diffusione e non rendono necessario, in molti casi, procedere alla cattura e al prelievo di sangue dell'animale.

La prova si è resa necessaria in quanto, come già detto, la tecnica dei RAPD è influenzata da molti fattori, tra cui anche la marca della Taq polimerasi e della macchina per PCR, inoltre in letteratura non risultavano lavori che paragonassero i profili RAPD ottenuti da diverse sorgenti di DNA.

Abbiamo dunque ricavato il DNA da individui di specie animali appartenenti rispettivamente alla classe «mammiferi» (bovino) e «uccelli» (fagiano), per sottoporlo ad analisi mediante RAPD e verificare che DNA di differente origine potessero essere usati indifferentemente. Nel caso del fagiano il DNA di ciascun individuo è stato estratto da tutte le cellule del sangue (compresi gli eritrociti) e dalle penne. Nel caso del bovino il DNA è stato estratto da linfociti, da pelo e da frammenti di unghioni.

## MATERIALI E METODI

### *Estrazione del DNA*

#### *Sangue*

Per il fagiano i linfociti e gli eritrociti sono stati separati mediante centrifugazione da un volume di 0.5 ml di sangue, mentre per il bovino sono stati utilizzati i linfoci-

ti, separati da 10 ml di sangue utilizzando Lymphoprep®. Dopo lavaggio con PBS le cellule sono state risospese in 10 ml *buffer* di estrazione (0.01 M TRIS pH 8; 0.1 M EDTA pH 8; 0.1 M NaCl; 0.5% SDS; 100 mg/ml proteinasi k nel caso del bovino o 200 mg/ml nel caso del fagiano) e lasciate in incubazione a 37° C per una notte. Dopo 2 estrazioni con fenolo-cloroformio ed una estrazione con solo cloroformio il campione è stato trattato con 20 ml/ml di RNasi a 37° C per 30'. Il DNA è stato quindi precipitato in 1/10 del volume di CH<sub>3</sub>COONa e 2 volumi di alcool etilico al 100% e recuperato con la punta chiusa di una pipetta *Pasteur*.

### *Fonti alternative*

Nel caso dell'estrazione del DNA dalle penne di fagiano, dal pelo e dagli zoccoli del bovino, il materiale, dopo lavaggio in acqua distillata ed acqua è stato sminuzzato in fini particelle con mezzi meccanici oppure polverizzato utilizzando azoto liquido, risospeso in 10 ml di *buffer* di estrazione (0.01 M TRIS pH 8.3; 50 mM KCl; NP40 0.9%; 300 mg/ml proteinasi k per penne e pelo, oppure 0.45 % NP40 - 0.45 % Tween 20; 0,01% gelatina; 0,5% SDS; 200 mg/ml proteinasi k nel caso degli zoccoli di bovino) ed incubato 1 notte a 37°. Nel caso delle penne di fagiano è stata sperimentata anche una incubazione breve a 56° per 60'. L'estrazione è proseguita come per le cellule del sangue, ma il DNA è stato recuperato mediante centrifugazione. Il pescaggio assicura l'integrità del DNA recuperato, mentre nel secondo caso il DNA potrebbe essere frammentato e di diversa origine, genomica e mitocondriale. Poiché la PCR amplifica anche minime quantità di DNA, è importante verificare da quale DNA stampo derivano i prodotti della reazione.

### *Reazioni di amplificazione*

Dopo opportuna diluizione e test di digestione i DNA genomici sono stati sottoposti ad amplificazione su una macchina per PCR della M.J. Medical. Il programma prevedeva: 1 minuto di *Hot Start* a 94°C e poi 1 minuto di denaturazione a 94°C, 1 minuto di *annealing* a 36°C e 2 minuti di *extention* a 72°C per un totale di 45 cicli. Le reazioni sono state condotte con 20 ng di DNA genomico, 100 nM di *primer* (kit P Operon Technology), 100 µM rispettivamente di dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 2 µl di *buffer* 10x per PCR Boehringer e 1 unità di Taq polimerasi della stessa ditta. Ciascun campione era ricoperto con 0.4 ml di olio minerale per prevenire l'evaporazione.

### *Rilevazione del DNA amplificato*

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio al 1.5% per 3-4 ore a 80 V e una volta colorati con bromuro di etidio fotografati sotto luce UV.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'estrazione del DNA a partire dal sangue, rispetto a quella effettuata a partire da altro materiale consente di recuperare una maggiore quantità di DNA, dell'ordi-

ne di decine di mg/ml, piuttosto che alcune unità di mg/g. Questo fa sì che mentre l'estrazione da materiali alternativi consente di ricavare una quantità di DNA sufficiente per effettuare una reazione di PCR, che amplifica anche ridottissime quantità di DNA, non lo è per metodologie quali gli RFLP che richiedono quantità superiori di DNA per effettuare le ibridazioni.

La frammentazione mediante bisturi di penne, unghioni e pelo non ha consentito alcun recupero di DNA anche con dosi elevate di proteinasi K (300 mg/ml) e incubazione *over night*.

Il congelamento dei campioni con azoto liquido e la macinazione fine in mortaio hanno invece consentito un recupero apprezzabile di DNA (tabella 1).

Per quanto riguarda il periodo di incubazione con proteinasi k, è risultato che un'incubazione più breve a temperatura superiore, rispetto a quella indicata nei protocolli impiegati comunemente per estrazioni da sangue, consente di ottenere dei risultati migliori rispetto ad un'incubazione più lunga a temperatura minore. Infatti come si osserva in figura 1 le bande amplificate a partire da DNA estratto da penne trattate *over night* con proteinasi K risultano più deboli. Questo risultato è probabilmente dovuto ad una maggiore degradazione del DNA che queste ultime condizioni determinano. I profili nel loro complesso non differiscono se non nelle bande più deboli.

Anche per quanto riguarda il bovino non si sono riscontrate differenze tra i profili RAPD ottenuti con DNA proveniente da differenti tessuti (figura 2).

La sostanziale identità dei profili ottenuti da sangue, in cui è presente solo DNA genomico, o da altre fonti, con DNA genomico e mitocondriale, dimostra che l'unico DNA amplificato è di origine genomica. Ovviamente questo risultato si riferisce ai *primers* della serie P della Operon da noi utilizzati, per cui impiegando altri *primers* è necessario procedere ad apposite prove preliminari.

Per entrambe le specie è da rilevare che alcune bande amplificate erano leggermente meno fluorescenti sul gel di elettroforesi. Questo fatto deve essere tenuto in considerazione se le analisi statistiche vengono effettuate a partire da profili RAPD ottenuti sia da sangue che da altri tessuti: in questo caso dovrebbero essere conteggiate solo le bande più forti o in alternativa dovrebbero essere utilizzati sistemi di rilevazione più sensibili come la Elettroforesi Capillare (11).

Riteniamo dunque che fonti di DNA alternative al sangue possano essere utilizzate proficuamente soprattutto quando i campioni debbano essere spediti a notevoli distanze e quando dell'animale disponiamo solo di alcuni campioni di tessuto. La tecnica è completamente affidabile nei casi in cui l'analisi mediante RAPD può essere condotta tenendo conto prevalentemente delle bande di maggiore intensità.

Tabella 1 - Quantità di DNA ricavata da differenti materiali.

Sorgente DNA	Quantità DNA recuperata (mg/g)
Penne	1.5
Unghioni	1
Pelo	3

## BIBLIOGRAFIA

- 1) DAMIANI G., BARDIN M. G., COMINCINI S., BANDI C., SANGALLI S., GANDINI G., BOLLA P., CAROLI A., ROGNONI G. (1993) *Stima delle relazioni genetiche tra alcune specie di bovidi e tra diverse razze bovine*. Atti della 1° conferenza nazionale su: stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche. 147-156.
- 2) DWEIKAT I., MACKENZIE S., LEVY M., OIIM H. (1993) *Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species*. T. A. G. 85, 497-505.
- 3) HALEY S. D., MIKLAS P. N., STAVELY J. R., BYRUM J., KELLY J. D. (1993) *Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean*. T. A. G. 86, 505-512.
- 4) LEVIN I., CRITTENED L. B., DOGSON, J.B. (1993) *Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers*. Genomics 16, 224.
- 5) SAIKI R. K., GELFAND D. H., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R. H., HORN G. T., MULLIS K. B., ERICH H. A. (1988) *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science 239, 487-491.
- 6) VALENTINI A., PORCEDDU A., DADATI E. (1993) *Impiego di RAPD per lo studio della variabilità genetica in bovini di razza frisona italiana*. Atti della 1° conferenza nazionale su: Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche. 157-161.
- 7) WELSH J., MCCLELLAND M. (1990) *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. N. A. R. 189, 7213-7218.
- 8) WELSH J., PETERSEN C., MCCLELLAND M. (1991) *Polymorphism generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping*. N. A. R. 19, 303-306.
- 9) WILLIAMS J., KUBELIK A., LIVAK K., RAPALSKI J., TINGEY S. (1990) *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. N. A. R. 18, 6531-6535.
- 10) WILLIAMS J. G. K., REYER R. S., YOUNG, R. M. (1993) *Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers*. N. A. R. 21, 2697.
- 11) ZOLLA L., VALENTINI A., PAPA F., CAPPUCCIO I. (1994) *Detection of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) products by Capillary electrophoresis*. In corso di stampa.



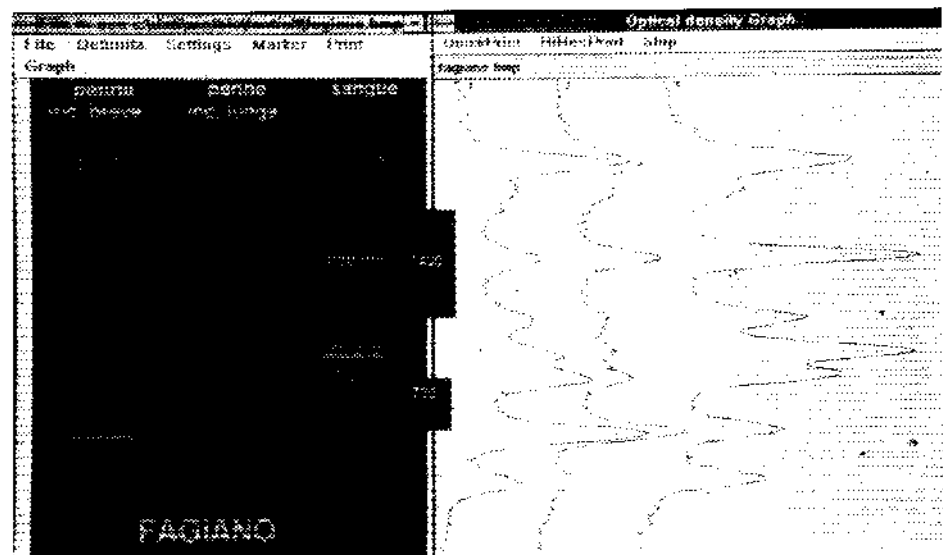


Figura 1 - Profilo RAPD di DNA di fagiano estratto da penne con incubazione breve o lunga con proteinasi K e da sangue (rispettivamente *lanes* 1-3).

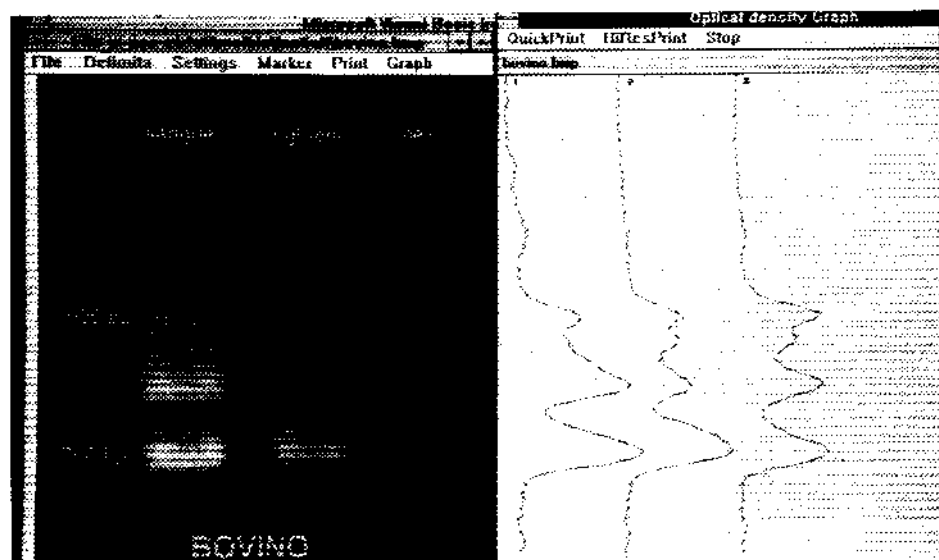


Figura 2 - Profilo RAPD di DNA bovino estratto da linfociti, unghioni e pelo (rispettivamente *lanes* 1-3).