

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Zootecniche

Miglioramento genetico – Modulo di miglioramento genetico degli organismi di interesse agrario

Esercitazione: determinazione del genotipo al locus della Miostatina in bovini di razza Marchigiana mediante test rapido PCR-RFLP (Restricted fragment length polymorphism).

BASI MOLECOLARI DELL'IPERTROFIA MUSCOLARE NELLA RAZZA MARCHIGIANA

L'ipertrofia muscolare (dal greco *iper* = molto e *trofo* = forma, crescita) consiste nello sviluppo estremamente accentuato delle masse muscolari soprattutto, almeno per quanto riguarda la specie bovina, nelle regioni che più concorrono alla produzione di tagli di prima qualità (Filippini, 1994). Tale fenotipo nei soggetti di razza Marchigiana è dovuto alla presenza di una mutazione puntiforme a livello del gene che codifica per la proteina Miostatina, un fattore deputato al controllo dello sviluppo muscolare: il gene si attiva quando deve essere limitata la crescita del muscolo, inducendo un'azione proteolitica sulle miofibrille. La mutazione è dovuta ad una transversione di una Timina con una Guanina in posizione 874 del III esone del gene per la Miostatina. Tale sostituzione, comporta il cambiamento di un codone che codifica per l'acido glutammico in un codone di stop, causando, in fase di traduzione, la creazione di una proteina troncata. Quindi, la Miostatina nella Marchigiana con ipertrofia muscolare presenta una struttura primaria deficitaria di ben 6 cisteine, condizione che comporta la totale inefficienza della proteina stessa portando così alla comparsa del fenotipo ipertrofico.

AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR (REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI) DI UNA PORZIONE DEL III ESONE DELLA MIOSTATINA.

- La determinazione del genotipo al locus della Miostatina prevede una prima amplificazione di una porzione del III esone della Miostatina al cui interno può essere presente la base oggetto della mutazione puntiforme. Il prodotto di amplificazione atteso è un frammento di 448 bp (base pair).

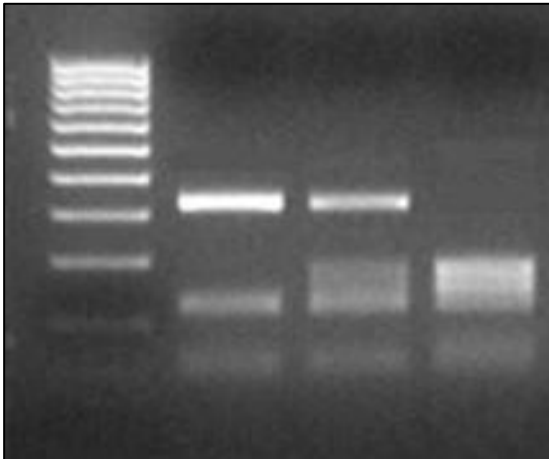
- La reazione deve essere condotta a partire dal DNA genomico dei soggetti da testare oltre ad un controllo negativo, con le condizioni di reazione sotto riportate in un volume complessivo di reazione pari a 25 µl:

DNA stampo (circa 50 ng)	1 µl
PCR buffer 10 X	2,5 µl
DNTPs 10 mM	0,5 µl
Primer F. 10 µM	0,25 µl
Primer R. 10 µM	0,25 µl
MgCl ₂ 25 mM	3,0 µl
Taq polimerasi (5U/ µl)	0,2 µl
Acqua per biologia mol.	17,30 µl

PRIMER	Condizioni di reazione
<i>Miostatina F.</i> – 5' tgagtccttgaggtaggagagtg 3'	94° C – 5'
<i>Miostatina R.</i> – 5' ggggaagaccttccatgtt 3'	30 cicli di:
	94° C – 30''
	57° C – 30''
	72° C – 1'
	finire con:
	74° C – 3'

- Un'aliquota (5 µl) del prodotto di PCR deve essere sottoposta a corsa elettroforetica (100 V) su gel d'agarosio al 1,2% in tampone TAE (Tris-Acido acetico EDTA) 0,5X e visualizzata mediante esposizione ad un transilluminatore a raggi ultravioletti.
- Il rimanente prodotto di PCR (circa 20 µl), per ciascun campione, deve essere sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione Tru9I (M-Medical) per 1 ora a 65° C. I prodotti della digestione dovranno essere separati mediante corsa elettroforetica (100 V) in gel d'agarosio al 2% in tampone TAE 0,5X e visualizzati mediante esposizione ad un transilluminatore a raggi ultravioletti.

- Il prodotto di PCR (448 bp) ottenuto a partire dal DNA di soggetti normali contiene 3 siti di restrizione (sequenza TTAA) per l'enzima Tru9I. Dopo la digestione si producono, pertanto, 4 frammenti (321, 96, 16 e 15 bp). La mutazione per l'ipertrofia delle masse muscolari introduce un ulteriore sito di restrizione: i frammenti prodotti dopo la digestione saranno, questa volta, 5 (173, 148, 96, 16 e 15). L'elettroforesi dei prodotti della digestione permette quindi di determinare, ogni volta, il genotipo degli animali.



Nella figura a lato è riportata l'immagine di una corsa elettroforetica in cui si distinguono da sinistra a destra: marker di peso molecolare 100-1000 bp, omozigote mutato, normale ed eterozigote.