



Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna

**SVILUPPO DI TECNOLOGIE
BIOMOLECOLARI APPLICATE AL DNA
MITOCONDRIALE PER LA
CARATTERIZZAZIONE DELLA SPECIE
DI ORIGINE DI LINEE CELLULARI**

PRC2004013

Dott.ssa M. Ferrari

Identificazione ed organizzazione unità operative

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e della Emilia Romagna
- Reparto Substrati Cellulari



Attività svolta

- Sviluppo di una metodologia per l'identificazione di specie basata sull'analisi del DNA mitocondriale

SCELTA DEL DNA MITOCONDRIALE

- **Numerose copie in ogni cellula**
- **Elevata stabilità anche in matrici complesse**
- **Sequenze conservate nella stessa specie e divergenti in specie diverse**



Risultati

DISEGNO SPERIMENTALE: PCR-RFLP SU UNA PORZIONE DEL *cytb*

- Coltura cellulare congelata
- Estrazione di DNA
- Quantificazione DNA (spettrofotometro)
- PCR con un'unica coppia di *primers* universale
- Digestione dell'amplificato con 6 enzimi di restrizione
- Elettroforesi su gel di agarosio
- Lettura dei risultati e confronto con dati derivati dall'analisi bioinformatica



ACCERTAMENTO DELLA SENSIBILITA' DELLA REAZIONE

**Contaminazioni di DNA
ottenuto da cellule di gatto
con DNA derivato da
cellule di capra:**

lane 1: gatto 90%

lane 2: gatto 50%

lane 3: gatto 33%

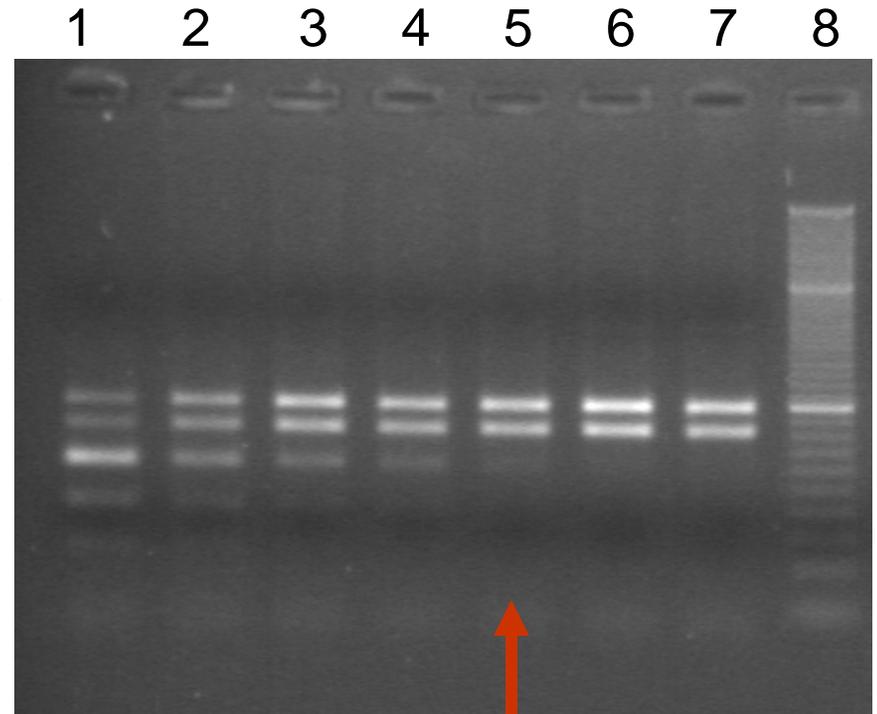
lane 4: gatto 25%

lane 5: gatto 10%

lane 6: gatto 5%

lane 7: gatto 2.5%

lane 8: marker 20bp



**Contaminazioni fino al 10%, pari a
5 ng / reazione di DNA contaminante
in una quantità totale di DNA pari a
50 ng / reazione**

RISULTATI OTTENUTI MEDIANTE ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE

- Identificazione di 22 specie
- 4 specie con profilo di restrizione dubbio
- La sensibilità della metodica è paragonabile alla metodica ufficiale della Farmacopeia europea
- Necessità di effettuare una *multiplex-PCR* per identificare le 4 specie dubbie

LIMITI

non consente di determinare contaminazioni intraspecie

CONTAMINAZIONI INTRA-SPECIE

DNA fingerprinting

Individuazione di un profilo unico
caratteristico di una linea cellulare,
anche appartenente alla stessa specie

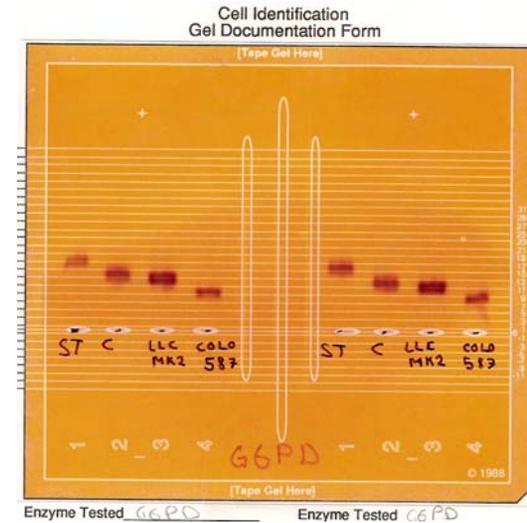
Ricadute dei risultati

- Controllo su prodotti alimentari e farmaceutici
- Possibile impiego nell'identificazione delle sofisticazioni alimentari
- Sicurezza nel trapianto cellulare
- Esecuzione di *ring test* a livello nazionale e in futuro internazionale



Ricadute dei risultati

- Affiancamento all'analisi isoenzimatica



- Inserimento nelle linee guida della Farmacopeia Internazionale
- *Barcode of life*

Publicazioni

In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal
DOI 10.1007/s11626-008-9125-x

An alternative method to isoenzyme profile for cell line identification and interspecies cross-contaminations: cytochrome *b* PCR-RLFP analysis

**Claretta G Losi • Stefania Ferrari • Enrico Sossi •
Riccardo Villa • Maura Ferrari**

Received: 10 March 2008 / Accepted: 16 May 2008 / Editor: J. Denry Sato
© The Society for In Vitro Biology 2008

Presentazioni Congressi

- Corso teorico-metodologico: 20 Febbraio 2007 Istituto Nazionale per lo Studio e Cura dei tumori
- ISBER 2007 Annual Meeting May, 30 - June,2 2007 Singapore
- Scuola Estiva Teorico-Pratica di Proteomica - III Edizione, Alghero 2007

Sviluppi futuri

- **Metodologie tradizionali**

FUTURO??

- **Approcci molecolari**
- **Identificazione delle caratteristiche proprie delle colture cellulari impiegate a scopo terapeutico e biologico**



Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna



Grazie per la vostra attenzione

"La ricerca corrente in Italia e nell'IZSLER", Brescia 14.12.2009