

INDAGINI DI SPETTROMETRIA DI MASSA PER L'IDENTIFICAZIONE DI QUATTRO SPECIE DEL GENERE *THUNNUS*

MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS FOR THE IDENTIFICATION OF THUNNUS GENUS FOUR SPECIES

Pepe T.¹, Ceruso M.¹, Carpentieri A.², Ventrone I.¹, Amoresano A.², Anastasio A.¹

¹Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti – Università di Napoli

²Dipartimento di Chimica organica e Biochimica – Università di Napoli

SUMMARY

An accurate identification of similar fish species is necessary to prevent illegal substitution and is imposed by labeling regulations in UE countries (1). The genus *Thunnus* comprises many species of different quality and commercial value. The increasing trade of fish preparations of the species included in this genus and the consequent loss of the external anatomical and morphological features enables fraudulent substitutions. This study reports data relating to the proteomic analysis of four tuna species (*T. thynnus*, *T. alalunga*, *T. albacares*, *T. obesus*). Sarcoplasmic proteins were studied by mono and two dimensional electrophoresis. The most significant proteins for the characterization of the species were analyzed by mass spectrometric techniques. As reported in a previous study (2), an accurate identification of the species seems possible, owing to the polymorphism displayed by the species of the *Thunnus* genus.

KEYWORDS

Proteomics, species identification, *Thunnus*, two dimensional electrophoresis (2-DE), mass spectrometric techniques.

INTRODUZIONE

Le specie appartenenti al genere *Thunnus* sono spesso consumate sotto forma di prodotti preparati e trasformati, per i quali non è possibile procedere al riconoscimento di specie mediante la semplice osservazione dei caratteri morfologici. Le loro carni hanno tuttavia diverso valore organolettico e merceologico e provengono inoltre da aree geografiche diverse, con possibile presenza di differenti contaminanti sia biologici, quali batteri e virus, sia chimici. Le frodi commerciali per vendita di una specie in luogo di un'altra possono pertanto avere anche implicazioni di carattere sanitario di varia entità, per cui si rende necessaria l'applicazione di tecniche analitiche in grado di differenziare le specie. La PCR è considerata la tecnica di elezione, poiché il DNA è una molecola termostabile, quindi resistente ai trattamenti termici a cui può essere sottoposto

il tonno durante le fasi di lavorazione. Tuttavia il riconoscimento di specie è particolarmente complesso, qualora le specie presentino un elevato grado di omologia, come nel caso del genere *Thunnus*. I geni marcatori molecolari di specie sono *cytb 16S* e *12S* mitocondriali. Da precedenti studi risulta che, per le specie del genere *Thunnus*, essi sono poco discriminanti poiché presentano scarsi polimorfismi espressi da mutazioni puntiformi. Pertanto si rende necessario indagare altri tratti del genoma che presentino maggiori polimorfismi di specie. Lo sviluppo ed i progressi dei metodi e delle tecnologie di analisi hanno aperto nuovi scenari di indagine, conferendo alle proteine un ruolo di crescente importanza, capace di suscitare un interesse sempre maggiore presso la comunità scientifica internazionale. Per queste ragioni la proteomica, ovvero lo studio del completo corredo proteico espresso da una cellula o da un tessuto (3) di un individuo, si rivela

complementare alla genomica.

Negli ultimi anni sono state condotte indagini basate sullo studio del profilo proteomico di alcune specie ittiche al fine di valutare e comparare la qualità di prodotti allevati rispetto a quelli pescati in mare aperto (4). Più recentemente lo studio del proteoma è stato applicato al riconoscimento di specie (5). A tale proposito Pepe et al. (2) hanno condotto un'indagine finalizzata allo studio del *pattern* proteico delle specie *T. alalunga*, *T. albacares* e *T. thynnus*. Tale studio è stato condotto mediante elettroforesi bidimensionale e applicazione successiva di tecniche di spettrometria di massa ed ha permesso di evidenziare la presenza di uno spot proteico specifico per la specie *T. thynnus*. Scopo di questo studio è stato quello di proseguire la precedente indagine estendendo le analisi di spettrometria di massa alle specie *T. alalunga*, *T. albacares* e *T. obesus* al fine di verificare l'eventuale presenza di proteine specifiche anche per queste specie.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati n. 6 esemplari del genere *Thunnus*, di cui n. 2 *T. thynnus* e n. 2 *T. alalunga* pescati nel Mediterraneo e reperiti presso il mercato ittico di Pozzuoli (Na), n. 2 *T. albacares* provenienti dall'Oceano Indiano e reperiti presso il PIF di Salerno, n. 2 *T. obesus* provenienti dall'Oceano Atlantico Sud Orientale e pervenuti dagli Stati Uniti.

L'estrazione delle proteine è stata effettuata prelevando 3 g di tessuto muscolare da ogni campione, seguendo il protocollo di Carrera et al. (5). La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata mediante saggio di Bradford. Successivamente le proteine di ciascuna specie sono state sottoposte ad elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE) di screening. La IEF degli estratti è stata effettuata utilizzando strip di gel di 7 cm di lunghezza in un range di pH 3-10 non lineare. La seconda dimensione (SDS-PAGE) è stata eseguita su un gel al 12,5% di acrilammide, con amperaggio costante di 25 mA per gel. La colorazione delle mappe proteiche è stata effettuata attraverso l'utilizzo di una soluzione colloidale di blu di Comassie. Il *software* utilizzato per l'analisi delle immagini dei gel di elettroforesi bidimensionali è stato l'ImageMaster™ 2D Platinum. Gli *spot* più significativi ai fini differenziativi di specie, identificati attraverso il *software*, sono stati escissi dal gel e sottoposti ad un protocollo di idrolisi *in situ*. L'analisi MALDI/MS, in modalità *reflector*, delle miscele di idrolisi è

stata effettuata mediante lo spettrometro MALDI-TOF Voyager DE-STR (Applied Biosystems). I dati raccolti mediante MALDI/MS sono stati utilizzati per l'identificazione delle proteine incognite con il *software* Mascot che paragona i valori di massa inseriti con quelli derivati da una digestione virtuale (*in silico*) di ciascuna delle proteine presenti nella banca dati selezionata (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF). La ricerca è stata effettuata nella banca dati NCB (National Center for Biotechnology Information), restringendo l'analisi alla tassonomia d'interesse. Poiché ad oggi sono stati sequenziati pochi tratti del genoma di *Thunnus*, l'identificazione delle proteine analizzate è avvenuta per omologia (tramite BLAST) con proteine presenti in Genbank.

RISULTATI

L'SDS-PAGE degli estratti proteici ha evidenziato un elevato grado di polimorfismo tra le quattro specie del genere *Thunnus*, in particolare per le bande proteiche con peso molecolare inferiore ai 10 KDa. Le 2-DE hanno permesso di evidenziare differenze qualitative consistenti e dettagliate tra le specie in analisi, osservabili già ad una semplice osservazione degli spot. L'analisi delle immagini mediante *software* dedicati ha evidenziato la presenza di *spot* proteici caratteristici per ciascuna specie. Gli *spot* più significativi sono stati sottoposti a protocollo di identificazione mediante tecniche di spettrometria di massa per valutare la possibilità di utilizzare le proteine identificate come *markers* di specie (tabella 1).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La proteomica appare una scienza in grado di accrescere le nostre conoscenze sulle proteine, sugli animali e sui prodotti di origine animale (6). In particolare l'analisi del *pattern* proteico degli esemplari indagati ha rappresentato un valido supporto per discriminare tra le specie. L'analisi delle immagini di gel bidimensionali, condotta mediante *software* ImageMaster™ 2D Platinum, ha evidenziato elevato grado di omologia tra le specie appartenenti al genere *Thunnus* ma è stato comunque possibile individuare *spot* proteici specifici per ciascuna delle specie oggetto di indagine ed identificare le proteine mediante tecniche di spettrometria di massa.

Ulteriori evoluzioni di questo studio sono in corso per risalire al gene che codifica le proteine

identificate come specie-specifiche, allo scopo di individuare tratti del genoma dei tonni che presentino un maggiore polimorfismo di specie rispetto ai tratti finora utilizzati in letteratura. Tale approccio consentirebbe di disegnare

primers specifici che permettano il riconoscimento di specie anche in prodotti trasformati tramite l'utilizzo di tecniche molecolari di *routine*.

Tabella 1. Proteine identificate come possibili *markers* di specie.

Specie	Proteina	Numero di accesso	Note
<i>T. thynnus</i>	Trioso fosfato isomerasi	gi46909469	Triosephosphate isomerase [Priapulus caudatus] Mw: 22874; pI : 6.51 identificata con BLAST (score 421) LC/MS/MS
<i>T. alalunga</i>	Piruvato chinasi	gi40786398	Pyruvate kinase, muscle [Danio rerio] Mw: 58591; pI : 6.54 identificata con BLAST (score 1052) LC/MS/MS
<i>T. albacares</i>	Troponina T	gi20386541	Fast skeletal muscle troponin T [Gadus morhua] Mw 27211, pI : 9.48 identificata con BLAST (score 269) LC/MS/MS
<i>T. obesus</i>	Lisozima C	gi126608	Lysozyme C precursor (Allergen Gal d 4) (Gal d IV), Mw 16750, pI : 9.37 identificata con BLAST (score 315) LC/MS/MS

BIBLIOGRAFIA

- Regolamento CE 104/2000 del Consiglio del 17 dicembre 1999. GUCE L 17/22, 21 gennaio 2001.
- Pepe T., Ceruso M., Carpentieri A., Ventrone I., Amoresano A., Anastasio A. (2009). Proteomic analysis for the identification of Thunnus genus three species. Abstracts. Atti LXIII Convegno Nazionale S.I.S.Vet., Udine 16-18 settembre 2009, 103.
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L., Hochstrasser D.F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensionalelectrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 14(1):61-65.
- Monti G., De Napoli L., Mainolfi P., Barone R., Guida M., Marino G., Amoresano A. (2005). Monitoring Food Quality by Microfluidic Electrophoresis, Gas Chromatography, and Mass Spectrometry Techniques: Effects of Aquaculture on the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Anal. Chem.*, 77: 2587-2594.
- Carrera M., Cañas B., Piñeiro C., Vázquez J., Gallardo J.M. (2007). De Novo Mass Spectrometry Sequencing and Characterization of Species-Specific Peptides from Nucleoside Diphosphate Kinase B for the Classification of Commercial Fish Species Belonging to the Family Merlucciidae. *J. Proteome Res.*, 6(8): 3070-3080.
- Pandey A. and Mann M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788): 837-846.