

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de Abril de 2006 (20.04.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/040373 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/000486

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de Septiembre de 2005 (08.09.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200402166
9 de Septiembre de 2004 (09.09.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
[ES/ES]; Rectorado Avenida de Séneca, 2, E-28040
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
BAUTISTA SANTA CRUZ, Jose Manuel [ES/ES];
Dpt. Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de
Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, E-28040
Madrid (ES). PUYET CATALINA, Antonio [ES/ES];
Dpt. Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de
Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, E-28040

Madrid (ES). SCHÖNHUTH MEYER, Susana [ES/ES];
Dpt. Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de
Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, E-28040
Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nue-
vamente cuando se reciba dicho informe

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: IDENTIFICATION OF DNA IN RAW OR PROCESSED FOODS AND COMPOUND FEEDS

(54) Título: IDENTIFICACIÓN DE ADN EN ALIMENTOS CRUDOS O PROCESADOS Y PIENSOS COMPUESTOS

(57) Abstract: The invention relates to the identification of DNA in processed foods and compound feeds. More specifically, the invention relates to a method of identifying the origin of DNA present in the composition of food products to be analysed. Said method is used to detect and determine if the food composition contains protein of vegetable, protein of animal origin or fish. In addition, if the origin of the meat is to be ascertained, the method can be used to determine if it is from a mammal or a bird. The inventive method requires 9 primer oligonucleotides having a specific design and in suitable concentrations. Said oligonucleotides have been designed such as to flank specific DNA sequences of different sizes. In this way, following multiple PCR amplification, it is possible to determine the origin of the foods in the prepared or non-prepared product. The invention enables the correct labelling of processed foods for which the general composition is required, such as for the certification of determined compound feeds for aquaculture that must only contain fish tissue or compound feeds for cattle or other ruminants that must only contain vegetable material. The inventive method offers a greater guarantee both for the consumers of the products (direct consumers, aquaculture farmers or cattle breeders) as well the producers of said food products and compound feeds.

(57) Resumen: Identificación de ADN en alimentos procesados y piensos compuestos. La invención consiste en un procedimiento para identificar el origen del ADN presente en la composición de los productos alimenticios a analizar. Este procedimiento detecta y diferencia si en la composición se halla presente proteína de origen vegetal, de origen animal, y si presenta pescado en su composición. Además, si lo que se pretende es conocer el origen de la carne, permite diferenciar si es de mamífero o de ave. Para dicho procedimiento se requieren 9 oligonucleótidos cebadores de diseño específico en las concentraciones adecuadas. Estos oligonucleótidos han sido diseñados de forma que flanquean secuencias específicas de ADN de diferente tamaño, por lo que tras la amplificación mediante PCR múltiple se puede diferenciar la procedencia de los alimentos que integran el producto ya sea elaborado o no. Esta invención permite el correcto etiquetado de los alimentos procesados de los cuales se precise su composición a nivel general como puede ser la certificación de determinados piensos compuestos para acuicultura que llevan en su composición únicamente tejido de pescado, o que los piensos compuestos para ganado bovino u otros rumiantes solo llevan en su composición materia vegetal. El método permite una mayor garantía tanto para los consumidores de los productos (consumidores directos, acuicultores o ganaderos) como para los productores de alimentos y piensos compuestos.



A2

WO 2006/040373



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

Identificación de ADN en alimentos crudos o procesados y piensos compuestos.

5

Objeto de la invención.

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a un sistema de detección e identificación del origen del ADN presente en alimentos homogéneos o heterogéneos, crudos o procesados, y
10 piensos compuestos mediante PCR múltiple para certificar la composición de dichos productos alimentarios. Este procedimiento se basa en la especificidad de 9 oligonucleótidos cebadores específicos que amplifican diferentes regiones del ADN cuando la muestra a analizar contiene proteína vegetal, animal e identifica si existe presencia de pescado, ave o mamífero, permitiendo la diagnosis diferencial al
15 producir amplicones de diferente tamaño.

Antecedentes.

Ante la creciente inquietud en los consumidores sobre la calidad y la seguridad de los productos alimenticios se han producido avances científicos y tecnológicos para
20 saber el origen de los diferentes tipos de alimentos de los que se compone un producto elaborado a partir de una mezcla heterogénea. Los primeros análisis utilizaban estudios de composición mediante métodos macromoleculares o químicos (Czesny y col., 2000, "Discrimination of wild and domestic origin of sturgeon ova based on lipids and fatty acid análisis", *Aquaculture* 189),
25 microscópicos o detección por métodos inmunológicos (Berger y col, 1988, "Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays", *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 71). Más recientemente, e impulsado tanto por las nuevas regulaciones de la Comunidad Europea (2000/766/EC; 2002/248/EC) en cuanto a medidas preventivas para la expansión
30 de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), como por los avances en la diagnosis de alimentos mediante técnicas de biología molecular, en la bibliografía científica se describen diversos sistemas para detección de especies en alimentos basados en la amplificación de regiones concretas de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método de microscopía basado en el análisis de
35 fragmentos de huesos ha sido reconocido como método europeo oficial para la

lucha contra la BSE diferenciando aves, mamíferos y pescado en las muestras. Pero sólo es útil cuando en la muestra existen estos fragmentos. Por otro lado, los sistemas basados en la detección de ADN no están supeditados a la degradación proteica de los alimentos con el procesado como indican Meyer y col, en 1994 para la detección de cerdo en productos cocinados ("Detection of pork in heated meta
5 products by the polymerase chain reaction", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77) y permiten una detección más fina en cuanto a cantidades mínimas de partida y una mayor especificidad en cuanto al origen de la muestra, como describen Matsunaga y col., en 1999 para la diferenciación entre 6 especies comunes de mamíferos ("A
10 quick and simple method for the identification of meta species and meta products by PCR assay". *Meat Sci.* 51), o posteriormente Lockley y Bardsley en 2000 para diferenciación entre dos especies de túnidos ("Novel meted for the discrimination of Tuna (*Thunnus thynnus*) and Bonito (*Sarda sarda*) DNA", *J. Agric. Food Chem* 48) o estos mismos autores 2 años después, para diferenciación entre pollo y pavo
15 ("Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA", *Meat Science* 61).

Los métodos bio-moleculares pueden dividirse en dos tipos generales: los sistemas que diferencian a nivel de unas pocas especies entre sí, que normalmente
20 necesitan de un sistema adicional de enzimas de restricción posterior (PCR-RFLP), por lo que el precio del análisis se ve incrementado, como indican Carrera y col. en 1999 para diferenciación de salmón y trucha ("Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication", *J. Food Science* 61) o Asensio y col. en 2000 para diferenciación de mero, perca y cherna ("Identification of Nile perch (*Lates niloticus*),
25 grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) by polimerasa chain reaction-restriction fragment length polymorphism of 12S rRNA gene fragment", *J. Food Prot.* 63); o por otro lado los sistemas que diferencian a nivel de grandes grupos de especies mediante PCR múltiple. Los sistemas que diferencian a nivel de grandes grupos se han centrado en la detección de material bovino
30 (Tartaglia y col., 1998. "Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials", *J. Food Prot.* 61; Wang y col, 2000: "A rapid meted for PCR detection of bobine materials in animal feedstuffs", *Mol. Cell Probes* 14), o más recientemente diferencian bovino, ovino, porcino y pollo en materia alimenticia (amplificación en duplex: Krcmar y

Rencova, 2003, "Identification of species-specific DNA in feedstuffs", *J. Agric. Food Chem* 51), y diferenciación entre rumiantes, cerdo, pollo en alimentos para peces (Bellagamba y col, 2003. "Polimerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal". *J. Food Prot.* 66) o en multiplex diferenciando rumiantes, pollo, cerdo y pescado en alimentos (Dalmaso y col. 2003, "A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs", *Mol. Cell. Probes*).

Por otro lado, los sistemas que diferencian varias especies o grupos de especies entre sí mediante PCR múltiple o con posterior utilización de enzimas de restricción son útiles en el caso de tener muestras homogéneas, ya que en el caso de muestras heterogéneas la interpretación de los patrones de restricción o de amplificación se hace muy difícil o imposible. Así se ha testado esto con Kits comerciales: diferenciación de las 6 especies más comunes de vertebrados mamíferos, pero sólo es efectivo con muestras homogéneas (Kit mixed, Biotools), identificación de las especies más comunes de mamíferos y aves (PCR y RFLPs), requiere digestión con enzimas de restricción y es difícil de interpretar con mezclas de más de 2 especies (Kit identification, Biotools), identificación de 6 especies diferentes de Bacalao (PCR y RFLPs) (Kit Cod, Biotools).

20 **Explicación de la invención**

Identificación de ADN en alimentos crudos o procesados y piensos compuestos.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la diagnosis e identificación de la composición de los alimentos mediante PCR múltiple utilizando oligonucleótidos específicos. De forma más concreta, la invención se refiere a un procedimiento para la identificación del ADN presente en alimentos homogéneos o heterogéneos, crudos o procesados, y piensos compuestos mediante la utilización de 9 oligonucleótidos cebadores originales (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9) diseñados específicamente para una amplificación mediante PCR múltiple y posterior visualización de diferentes patrones de electroforesis en geles de agarosa al 2%. Estos oligonucleótidos están diseñados en regiones concretas del ADN haciendo de cebadores específicos para ADN de plantas, animales, pescados, aves y mamíferos.

En una primera reacción de PCR múltiple, utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5, la amplificación específica produce un máximo de 3 amplicones diferenciando el ADN de procedencia vegetal (tanto hojas, tallos, semillas y frutas como tubérculos), el ADN de procedencia animal (las especies más comunes de vertebrados: aves, mamíferos y peces), y el ADN de pescado (Teleósteos).

En caso de querer detectar e identificar el origen de carnes de animal vertebrado, en otra reacción de PCR múltiple utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 9, la amplificación específica produce un máximo de 2 amplicones diferenciando el ADN procedente de ave o de mamífero.

Esta invención aporta la característica particular de que permite detectar e identificar la presencia de ADN tanto animal como vegetal y además permite diferenciar la procedencia del ADN respecto a los tres grupos de vertebrados más comunes utilizados en alimentos como son: aves, mamíferos y peces. Para una diagnosis completa de la muestra a analizar es necesaria la utilización de dos mezclas de oligonucleótidos cebadores en dos reacciones independientes de PCR múltiple. A diferencia de las existentes en el mercado, esta invención permite hacer un barrido completo de cualquier muestra orgánica identificando las cinco procedencias anteriormente descritas. En cambio otros kits disponibles solo distinguen dos procedencias (Planta-Vertebrado) en mezclas tanto homogéneas como heterogéneas mediante PCR múltiple, o permiten la diferenciación de los orígenes más comunes de aves y mamíferos, pero dicho sistema no es eficaz con mezclas heterogéneas pues da patrones de restricción de difícil interpretación. La presente invención ha mostrado una alta sensibilidad y rapidez, es más económica pues no necesita utilizar enzimas de restricción, además de permitir un barrido completo de muestras heterogéneas.

El procedimiento se caracteriza porque comprende dos combinaciones de 5 y 4 oligonucleótidos respectivamente, diseñados específicamente, a partir de diferentes regiones del genoma nuclear y mitocondrial, para la detección e identificación de los componentes de una muestra alimenticia heterogénea. Estas mezclas de oligonucleótidos permiten la amplificación de ADN de distinto origen para detección e identificación mediante PCR múltiple. Con este procedimiento, en una primera reacción de PCR múltiple (mezcla de oligos nº1) se diferencian tres procedencias: Planta-Animal (aves, mamíferos y peces)-Pescado, y en una

segunda reacción de PCR múltiple (mezcla de oligos nº2) podemos detectar la presencia de carne de animal, diferenciando si dicha carne procede de ave o de mamífero. El procedimiento completo permite la identificación básica de una muestra diferenciando 5 orígenes del ADN en dos reacciones de amplificación por PCR múltiple.

La identificación completa puede realizarse en dos reacciones de PCR múltiple. En la mezcla Nº1 tenemos 5 oligonucleótidos (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5) que diferencian planta, animal (aves, mamíferos y peces) y pescado. En la mezcla Nº2 tenemos 4 oligonucleótidos (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9) que diferencian entre carne de ave y de mamífero. La información y las secuencias de los 9 oligonucleótidos cebadores se muestran al final de esta memoria en la lista de secuencias.

En líneas generales y para conseguir los objetivos preconizados, a la vez que simplificar el sistema de diagnóstico, y sin utilizar una digestión posterior con enzimas de restricción que encarece el procedimiento, aumenta el tiempo requerido para obtener resultados y dificulta la detección de ADN en muestras heterogéneas, la presente invención proporciona los oligonucleótidos cebadores y el procedimiento para amplificar ADN de planta, animal, pescado, ave y mamífero en dos reacciones independientes de PCR que conforman un procedimiento de identificación rápido no existente hasta el momento en el mercado.

La acuicultura constituye un campo relevante de aplicación de esta invención. El desarrollo de una dieta orgánica, completa y equilibrada es una de las principales metas para los productores de piensos para acuicultura, tratando de encontrar reemplazamiento para los ácidos grasos y aminoácidos que hasta ahora solo provenían del pescado. Los aceites y harinas de plantas no contienen la cantidad necesaria de ácidos grasos insaturados ni provee el 100% de los distintos aminoácidos esenciales. Actualmente los componentes de diferentes orígenes se mezclan en los piensos para acuicultura, y una gran preocupación se basa en el riesgo que puede llevar la adulteración de los piensos con tejidos o huesos de mamíferos o aves. Este problema se exagera por el hecho de que no existen hoy en día técnicas fiables y rutinarias para detectar este tipo de adulteraciones. Con la invención que se detalla en esta memoria descriptiva, mediante amplificación por PCR múltiple, se identifica el origen de la composición proteica en las distintas

dietas ya sea de piensos compuestos de ganado o acuicultura como de alimentos procesados, permitiendo la detección de plantas o animales, y diferenciando dentro de los tres grupos principales de animales vertebrados: aves, mamíferos y peces. La PCR múltiple produce amplicones de diferente tamaño que son fácilmente identificables entre sí y cuyo tamaño se detalla a continuación:

1. longitud de los amplicones tras la PCR múltiple con la mezcla N° 1:

- Si se produce amplificación de ADN de procedencia vegetal obtendremos un fragmento de 400 nucleótidos.
- Si se produce amplificación de ADN de procedencia animal (aves, mamíferos o peces) obtendremos un fragmento de 260 nucleótidos.
- Si se produce amplificación de ADN procedente de pescado obtendremos un fragmento de 120 nucleótidos.

2. longitud de los amplicones tras la PCR múltiple con la mezcla N° 2:

- Si se produce amplificación de ADN de procedencia animal de origen aviar obtendremos un fragmento de 260 nucleótidos.
- Si se produce amplificación de ADN de procedencia de animal mamífero obtendremos un fragmento de 360 nucleótidos.

Con esta invención será posible la certificación de los alimentos y piensos compuestos en términos de asegurar su origen, ayudando a garantizar aquellos piensos que sean 100% de pescado (acuicultura) o piensos 100% planta (ganadería). Esta invención representa tanto para los productores de piensos como para los ganaderos y acuicultores un nuevo valor añadido a sus productos, y por otro lado da más seguridad y confianza a los consumidores de dichos productos.

Descripción de los dibujos

Para facilitar la comprensión de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva, se acompañan una serie de dibujos con carácter ilustrativo.

Figura 1: Muestra la visualización en un gel de agarosa MS8 al 2% de distintos patrones de banda (planta 400bp/ animal 260bp/ pescado 120bp) tras la amplificación mediante PCR múltiple de 12 muestras alimenticias diferentes utilizando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5. Las muestras

analizadas presentan en su composición tejido de 1, 2 ó 3 componentes (vegetal, animal y/o pescado):

- 1: Marcador Ladder 100 pb
- 2: Pienso acuicultura para doradas 1
- 5 3: Pienso para gatos
- 4: *Scomber japonicus* (Caballa)
- 5: Pienso acuicultura para doradas 2
- 6: *Galeorhinus sp.* (Cazón)
- 7: *Meleagris gallopavo* (Pavo)
- 10 8: *Soja sp.* (Soja)
- 9: *Triticum sp.* (Trigo)
- 10: *Salmo trutta* (Trucha)
- 11: Salchicha (Pollo+Cerdo)
- 12: Barritas de cangrejo
- 15 13: Codorniz+cebolla

Figura 2: Muestra la visualización en un gel de agarosa MS8 al 2% de los distintos patrones de banda (mamífero 360bp/ ave 260bp) tras la amplificación mediante PCR múltiple de 9 alimentos cárnicos. Las muestras analizadas presentan en su

20 composición tejido de 1 ó 2 componentes (mamífero y/o ave). Las muestras se analizaron con los oligonucleótidos SEQ ID NO: 6 a SEQ ID NO: 9.

- 1: Marcador Ladder 100 pb
- 2: *Equus caballus* (Caballo)
- 3: *Sus scrofa* (Cerdo)
- 25 4: *Bos taurus* (Vaca)
- 5: Queso
- 6: *Ovis aries* (Cordero)
- 7: *Gallus gallus* (Pollo)
- 8: *Anas sp.* (Pato)
- 30 9: Salchicha (Pollo+Cerdo)
- 10 : Pienso para perros

Exposición detallada de la invención

En la presente memoria se describe el procedimiento para diseñar y preparar oligonucleótidos de ADN específicos de planta, animal, pescado, mamífero y ave, así como la determinación del mejor protocolo de extracción de ADN para los distintos tipos de muestras a analizar.

- 5 Asimismo la invención se ilustra con ejemplos de realización del procedimiento de detección e identificación del origen del ADN en alimentos homogéneos, heterogéneos, crudos o procesados y piensos compuestos, usos de los oligonucleótidos de ADN, así como la forma de utilización del kit. En la lista de secuencias adjunta se presentan las secuencias individuales de oligonucleótidos
10 cebadores descritas en la dirección 5'->3' convencional.

Diseño de oligonucleótidos cebadores

- Para la selección de las secuencias específicas de cada grupo de especies (planta, animal, pescado, mamífero y ave) se analizaron gran número de secuencias
15 pertenecientes a cada grupo de especies. Para ello se utilizaron un total de 254 secuencias de plantas y animales, tanto de la base de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI) como secuencias propias obtenidas en el laboratorio. Una vez seleccionadas las secuencias más representativas de cada grupo, se procedió a su alineamiento mediante el programa
20 *ClustalX* descrito en *Nucleic Acid Research* 24 (Thomson y col, 1997). A continuación se analizaron las regiones variables y conservadas dentro de cada grupo y se procedió a la selección de secuencias específicas que produjesen un solo amplicón para cada grupo de especies y que a su vez tuvieran diferente tamaño para ser identificables en geles de agarosa. Posteriormente se
25 seleccionaron los oligonucleótidos de manera que la temperatura de hibridación fuera similar para cada grupo de cebadores que componen la mezcla en la PCR múltiple. El análisis teórico de los oligonucleótidos seleccionados en una primera fase (primer-dimer, temperatura de hibridación, hibridación entre oligonucleótidos, etc.) se realizó con el programa *Oligo-Analyzer* (Kuulasmaa, 2002). Para la
30 temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se consideró la $T_m(NN)$, determinada mediante los parámetros termodinámicos descritos por Breslauer y col, 1986 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83). De los oligonucleótidos analizados se seleccionaron los más adecuados y se procedió a su análisis práctico con diferentes condiciones de PCR, se ensayaron con diferentes muestras tanto crudas

como procesadas de mezclas homogéneas y heterogéneas. Además se procedió a la optimización de las condiciones de PCR con distintas concentraciones de ADN y con diferentes protocolos de extracción.

5 Selección de secuencias para *Plantas y Animales*.

Para el diseño de oligonucleótidos cebadores de estos dos grupos se utilizó la región de ADN nuclear del gen que codifica para el 18S ribosomal. Se alinearon conjuntamente 63 secuencias de plantas (16 especies incluyendo: trigo, apio, patata, cebada, arroz, maíz, *Arabidopsis* y soja), 1 de levadura, 1 de rodofita y 45
10 secuencias de animales tanto vertebrados (24 especies de todos los grupos principales: aves, mamíferos, peces, reptiles, anfibios) como invertebrados (21 especies: tanto artrópodos como moluscos) para el diseño de un oligonucleótido general en una región conservada tanto para animales como para plantas (caracterizado por SEQ ID NO: 5) y dos oligonucleótidos específicos. El cebador
15 específico de planta (caracterizado por SEQ ID NO: 1) se diseñó en una región conservada en las plantas que a su vez es diferente para los animales. Para el cebador específico de animales (caracterizado por SEQ ID NO: 2) se utilizó una región conservada en animales que a su vez es diferente para plantas y que produce un amplicón de tamaño diferente al de planta.

20

Selección de secuencias para *Pescado*.

Para el diseño de oligonucleótidos cebadores específicos de pescado (caracterizados por SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) se utilizó la región de ADN nuclear del gen que codifica la rodopsina. Para ello se amplificó una región de unos
25 500 pb de la rodopsina en 50 especies de teleósteos con protocolos y con oligonucleótidos diseñados expresamente para ello. Posteriormente se procedió a la secuenciación de los 50 amplicones así obtenidos. Estas secuencias se alinearon con secuencias de otras 100 especies diferentes de condricios y otros teleósteos obtenidas de NCBI. Se buscaron dos regiones conservadas en la mayoría de los
30 teleósteos para producir un amplicón diferenciable en tamaño de los producidos por los oligonucleótidos de planta y animal.

Selección de secuencias para animal vertebrado: Mamífero y Ave.

Para el diseño de oligonucleótidos cebadores específicos de carnes se utilizó la región de ADN mitocondrial del gen que codifica para el 12S ribosomal. Para ello se alinearon 41 secuencias obtenidas de NCBI de aves (10 especies que incluyen pollo, pato, pavo, avestruz y paloma), mamíferos (10 especies que incluyen cerdo, oveja, cabra, vaca y caballo) y peces (21 especies de distintos ordenes: tanto de teleósteos como de condricios). Se utilizaron cuatro regiones conservadas, dos regiones conservadas pero específicas para la mayoría de los mamíferos (caracterizadas por SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7) y dos regiones conservadas pero específicas para la mayoría de las aves (caracterizadas por SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9), teniendo en cuenta que cada pareja debería producir un amplicón diferenciable en tamaño entre sí.

Extracción previa de ADN.

Para aplicar el sistema de identificación sobre distintas muestras se extrajo ADN de alimentos de distintas procedencias: muestras simples con un solo componente (crudas o cocinadas) y mezclas heterogéneas (crudas y cocinadas), como se muestra en la tabla 1. El ADN se extrajo mediante diferentes protocolos: método de fenol-cloroformo descrito por Sambrook y col., (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual, 2º ed. Cold Spring Harbor Press. USA"; y método salino descrito por Salah y Martínez (1997) "Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques, *Nucleic Acids Research* 25 (22)". Se ha comprobado que para muestras que solo contienen tejido vegetal o muestras heterogéneas que presentan tanto tejido animal como vegetal, el método más apropiado es el de Salah y Martínez, mientras que si lo que interesa conocer es la procedencia de la carne o se trata de muestras de origen animal, el protocolo más adecuado es el que describen Sambrook y col. También se ensayaron extracciones de ADN con kits de distintas casas comerciales (*Qiagen*, *MoBio*, *TriReagent*, *Biotoools*, *PrepMan*, etc.) y con un robot automatizado para extracción de ADN (6100 Nucleic Acid Prep Station, Applied Biosystems) siendo la mayoría eficaces en caso de muestras homogéneas en cuanto a origen vegetal o animal.

Tabla 1: Muestras de ADN en las que se ha probado el sistema de identificación

Cereales y hortalizas
Arroz

Garbanzos
Trigo
Maíz
Patata
Calabaza
Cebolla
Soja
Tomate
Zanahoria
Cacahuete
Judías verdes
Hamburguesa vegetal (Tofu)
Puré de verduras
Puré patata
Puré de garbanzos
Carnes
Mamíferos: <i>Bos taurus</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Equus caballus</i> , <i>Ovis aries</i> , Canguro.
Aves: <i>Meleagris gallopavo</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Annas sp.</i> , <i>Meleagris sp.</i> , <i>Coturnix sp.</i>
Salchicha cerdo-pollo
Albóndigas
Hamburguesa + tomate
Carne+Besamel+Pimientos
Pescados
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina)
<i>Sardina pilchardus</i> (Sardina)
<i>Salmo trutta</i> (Trucha)
<i>Oncorhynchus mikiss</i> (Trucha arcoiris)
<i>Thunnus alalunga</i> (Bonito del norte)
<i>Sarda sarda</i> (Bonito)
<i>Scomber japonicus</i> (Caballa)
<i>Thunnus thynnus</i> (Atún rojo)
<i>Epinephelus marginatus</i> (Mero)
<i>Polyprion americanus</i> (Cherna)
<i>Lates niloticus</i> (Perca del Nilo)
<i>Merluccius</i> (Merluza)
<i>Xiphias gladius</i> (Pez espada)
<i>Salmo salar</i> (Salmón)
<i>Sparus aurata</i> (Dorada)
<i>Galeorhinus sp.</i> (Cazón)
<i>Muraena helena</i> (Morena)
<i>Gadus sp.</i> (Bacalao)
Paté de salmón
Bacalao con pimientos
Atún en aceite
Quesos
Pienso para acuicultura (diferente composición)
P1: Denmark Sprat (<i>Sprattus sprattus</i>)
P3: Denmark Whiting (<i>Merlangius merlangius</i>)
P5: Denmark Capelin (<i>Mallotus villosus</i>)
P6: Peru Anchovy (<i>Engraulis japonicus</i>)
P9: Chile Sardina común/Anchoveta (<i>S. pilchardus</i> o <i>Sardinops sagax</i> / <i>Engraulis japonicus</i>)
P14: Chile Jack mackerel (<i>Trachurus murphyi</i>)
P19: Denmark Pure sand eel (<i>Ammodytes marinus</i> ?)
P30: Peru Sardina/Jack mackerel/ Pacific mackerel)
P32: Peru Sardina/Jack mackerel
P34: Peru Anchovy
P43: Chile Mackerel
P48: Chile Hoky
Pienso A: Aceite de pescado
Pienso B: Mezcla (Arenque+Colza)

Pienso C: Aceite vegetal (Lino)
P48: Chile Hoky
SK.1: Torta de colza
SK.2: Torta de soja
SK.3: Trigo entero extrusionado
SK.4: Altramuz blanco dulce
SK.5: Harina de pescado
SK.6: Concentrado de proteína soluble de pescado
SK.7: Guisantes extrusionados
SK.8: Gluten de Maíz
SK.9: Gluten de trigo
SK.10: 100% dieta de pescado
SK.11: Harina de Krill
SK.12: Dieta comercial
SK.14: Dieta comercial
SK.15: Dieta comercial
SK.16: Dieta comercial
SK.17: 100% proteína de planta
Pienso de distintas dietas para Dorada
03-2408-1 Dieta A: PDA
03-2402-4 Dieta D: PDD
DA
DB
DC
DD
DE
DF
PP75: pienso con planta
FM: Fish meal
P.R: Proacua
P.Q: Proacua pequeño
Pienso de distintas dietas para Salmón
03-2409-1 Dieta A: PSA
03 2409-2 Dieta B: PSB
Pienso de distintas dietas para Lubina
P. lubina
Pienso para perros
Pienso con salmón: P. salmón
Pienso sin pescado: P. perros
Pienso para gatos
Pienso vegetal
Pienso para ganado V1
Pienso vegetal perros
Pienso para ganado y aves
Pienso para cerdos
Pienso para gallinas
Pienso para vacas
Pienso para conejos
Pienso para ratones

A continuación se describen unos ejemplos de realización preferida de la invención.

Ejemplo 1: Determinación de ADN de *Planta-Animal-Pescado*

En una realización preferida de la invención, se aplica el procedimiento a la detección e identificación de tres tipos de componentes en distintas muestras de piensos compuestos para alimentación.

- 5 Una vez extraído el ADN de las muestras en cuestión, a través del método salino o mediante kits comerciales, según se indica en el apartado anterior (Extracción previa de ADN), se procede a preparar la mezcla de productos para la amplificación en una reacción de PCR múltiple.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 μ l.

- 10 En primer lugar se añaden 14 microlitros (μ l) de agua bidestilada y autoclavada por cada muestra a analizar, más una de control negativo.

En segundo lugar se añaden el tampón comercial para la enzima (10X) a utilizar en la amplificación: 2,5 μ l por muestra más el control negativo.

- 15 En tercer lugar se añaden 3 μ l de Cloruro de Magnesio 25 mM por cada muestra más el control negativo.

En cuarto lugar se añaden 1,6 μ l de la mezcla de dNTPs (2,5 mM de cada nucleótido) por muestra más el control negativo.

- 20 En quinto lugar se añaden los 5 oligonucleótidos específicos de los tres tipos de tejido a detectar en el pienso. Partiendo de una concentración de 10 μ M añadiremos las siguientes cantidades por cada muestra a analizar más el control negativo: 0,5 μ l de SEQ ID NO: 1; 0,6 μ l de SEQ ID NO: 2; 0,7 μ l de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; y 1,1 μ l de SEQ ID NO: 5.

Por último, añadiremos 0,16 μ l de la enzima polimerasa (puesto a punto para TaKaRa Ex *Taq*, 5 U/ μ l) por cada muestra a analizar más el control negativo.

- 25 Se harán alícuotas de 23 μ l de la mezcla para el mismo número de muestras a analizar, más el control negativo.

- 30 Posteriormente añadiremos 2 μ l de ADN previamente extraído a cada alícuota (la concentración del ADN extraído es muy variable, pudiendo oscilar entre 10 y 250 ng/ μ l, por lo que en casos de presentar elevada concentración puede ser necesario su dilución para evitar inhibiciones en la PCR).

Para las reacciones de amplificación en PCR múltiple el termociclador se programó con una fase inicial de 30 segundos a 95° C, seguido de 40 ciclos con tres fases (30 segundos a 94° C; 30 segundos a 56° C; 10 segundos a 72° C), y finalmente 7 minutos a 72° C (puesto a punto en aparatos de la marca Eppendorf).

Por último, para la identificación de los componentes de las muestras problema visualizaremos la amplificación tras una electroforesis en gel de agarosa (puesto a punto para la agarosa MS8 al 2% de Hispanagar, CONDA S.A).

La figura 1 ilustra los resultados obtenidos en el análisis de 12 muestras.

5

Ejemplo 2: Determinación de ADN de Mamífero-Ave

En otra forma de realización preferida de la invención, se aplica el procedimiento a la detección e identificación de dos tipos de carnes de vertebrado en distintas muestras de piensos compuestos para alimentación de mascotas y alimentos preparados.

10

Una vez extraído el ADN de las muestras en cuestión, a través del protocolo convencional de Fenol-Cloroformo o mediante Kits comerciales, según se ha indicado previamente, se procede a preparar la mezcla de productos para la amplificación en una reacción de PCR múltiple.

15 Las reacciones de amplificación por PCR se llevan a cabo en un volumen de reacción de 25 μ l.

En primer lugar se añaden 15 μ l de agua bidestilada y autoclavada por cada muestra a analizar, más una de control negativo.

20 En segundo lugar se añaden el tampón comercial para la enzima (10X) a utilizar en la amplificación: 2,5 μ l por muestra más el control negativo.

En tercer lugar se añaden 3 μ l de Cloruro de Magnesio 25 mM por cada muestra más el control negativo.

En cuarto lugar se añaden 1,6 μ l de la mezcla de dNTPs (2,5 mM de cada nucleótido) por muestra más el control negativo.

25 En quinto lugar añadiremos los 4 oligonucleótidos específicos de los dos tipos de carnes a detectar en el pienso. Partiendo de una concentración de 10 μ M añadiremos las siguientes cantidades por cada muestra a analizar más el control negativo: 0,7 μ l de SEQ ID NO: 6; 0,7 μ l de SEQ ID NO: 7; 0,7 μ l de SEQ ID NO: 8 y 0,7 μ l de SEQ ID NO: 9.

30 Por último, añadiremos 0,16 μ l de la enzima polimerasa (puesto a punto para TaKaRa Ex Taq, 5 U/ μ l) por cada muestra a analizar más el control negativo.

Se hacen alícuotas de 23 μ l de la mezcla para el mismo número de muestras a analizar, más el control negativo.

Posteriormente se añaden a cada alícuota 2 µl de una dilución 1/2 del ADN previamente extraído (la concentración del ADN extraído es muy variable, pudiendo oscilar entre 10 y 250 ng/µl, por lo que en casos de presentar elevada concentración puede ser necesario su dilución para evitar inhibiciones en la PCR).

- 5 Para las reacciones de amplificación en PCR múltiple el termociclador se programó con una fase inicial de 30 segundos a 95° C; seguido de 40 ciclos con tres fases (30 segundos a 94° C; 30 segundos 58° C; 10 segundos a 72° C), y finalmente 7 minutos a 72° C (puesto a punto en aparatos de la marca Eppendorf).

- 10 Por último, para la identificación de los componentes de las muestras problema visualizaremos los productos de amplificación tras una electroforesis en gel de agarosa (puesto a punto para la agarosa MS8 al 2% de Hispanagar, CONDA S.A). La figura 2 ilustra los resultados obtenidos en el análisis de 9 muestras.

Ejemplo 3: Diseño de un kit

- 15 El presente ejemplo se refiere a un kit para la determinación específica de la presencia de planta, animal, pescado, mamífero o ave en muestras alimentarias o piensos compuestos utilizando 9 cebadores específicos en dos reacciones de PCR múltiple.

Se ensambló un kit para 20 reacciones con la siguiente composición:

- 20 - Un envase con premezcla de PCR constituida por: dNTPs (2,5 mM de cada uno), tampón de PCR (10X), mezcla de 5 oligonucleótidos para amplificación de ADN de planta, animal y pescado (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 5) y agua destilada estéril.
- Un envase con premezcla de PCR constituida por: dNTPs (2,5 mM de
25 cada uno), tampón de PCR (10X), mezcla de 4 oligonucleótidos cebadores para amplificación de ADN de mamífero y ave (SEQ ID NO:6 a SEQ ID NO:9) y agua destilada estéril.
- Un envase con TaKaRa Ex Taq (5 u/µl)
- Un envase con marcador de talla (100 bp Ladder)
- 30 - Un envase con MgCl (25 mM).
- Un envase con mezcla de ADN de planta y pescado.
- Un envase con mezcla de ADN de mamífero y de ave.

Finalmente se adjuntaron instrucciones de uso, así como consejos respecto a los protocolos de extracción de ADN previo a la utilización del kit, e interpretación posterior de los resultados de amplificación.

REIVINDICACIONES:

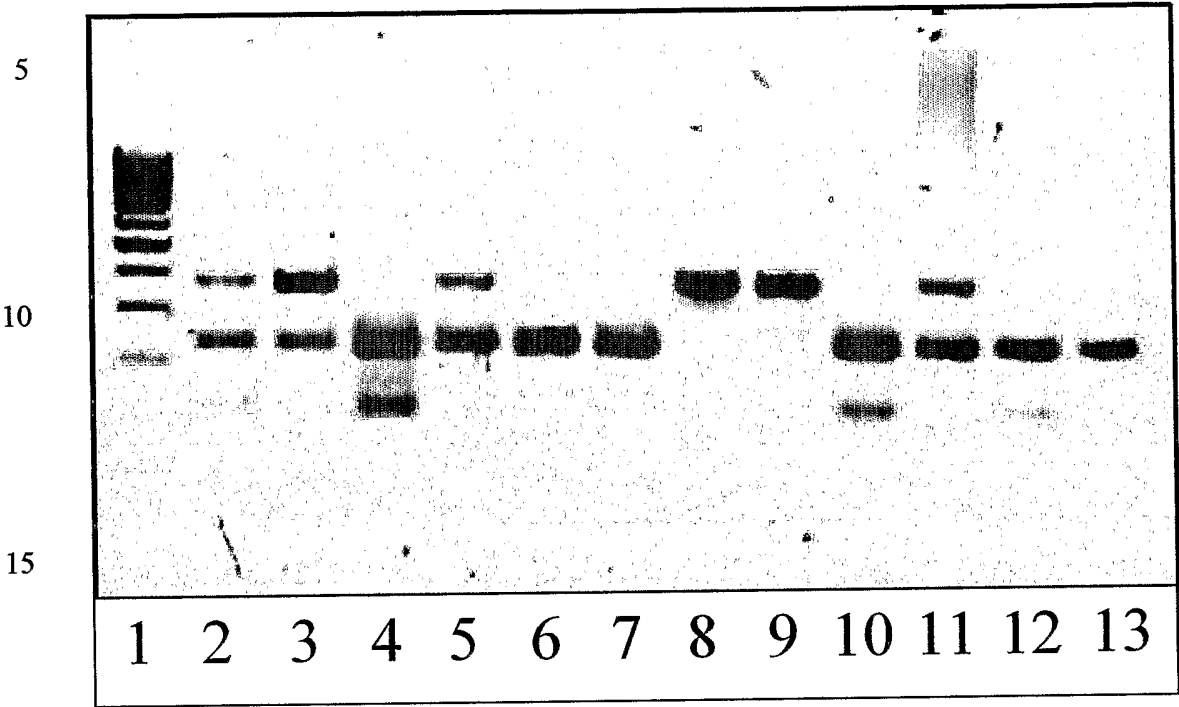
- 5 1. Oligonucleótidos de ADN específicos de plantas, animales y de los distintos grupos de animales vertebrados (peces, aves, mamíferos), caracterizados porque tienen las siguientes secuencias:
 - a. Una secuencia de ADN elegida del grupo constituido por las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 9 ó
 - 10 b. Una secuencia de ADN que en condiciones rigurosas hibrida con una secuencia según (a) o versiones degeneradas, más cortas o más largas de la misma, y que es específica de plantas, animales o de los distintos grupos de animales vertebrados (peces, aves, mamíferos).
- 15 2. Un amplicón de ADN de planta, caracterizado porque está constituido por la amplificación mediante una combinación de los oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos, según reivindicación 1.
- 20 3. Un amplicón de ADN de animal caracterizado porque está constituido por la amplificación mediante una combinación de los oligonucleótidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos, según reivindicación 1.
- 25 4. Un amplicón de ADN de pescado caracterizado porque está constituido por la amplificación mediante una combinación del oligonucleótido SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos, según reivindicación 1.
- 30 5. Un amplicón de ADN de mamífero caracterizado porque está constituido por la amplificación mediante una combinación de los oligonucleótidos SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos, según reivindicación 1.
6. Un amplicón de ADN de ave caracterizado porque está constituido por la amplificación mediante una combinación de los oligonucleótidos SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos, según reivindicación 1.
7. Un método de detección e identificación del origen del ADN en alimentos tanto homogéneos como heterogéneos, crudos o procesados y piensos

- compuestos, caracterizado porque se utilizan oligonucleótidos cebadores específicos, según reivindicación 1, en una reacción de PCR sobre el ADN aislado de la muestra a analizar, con lo que se determina la presencia de Planta, Animal, Pescado, Mamífero o Ave basándose en el tamaño de los productos de ADN formados tras la amplificación.
- 5
8. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de origen vegetal en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de planta utilizando una mezcla de 2 oligonucleótidos cebadores según la reivindicación 2.
- 10
9. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de origen animal en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de animal utilizando una mezcla de 2 oligonucleótidos cebadores según la reivindicación 3.
- 15
10. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de pescado en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de teleósteos utilizando una mezcla de 2 oligonucleótidos cebadores según la reivindicación 4.
- 20
11. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de animal vertebrado de origen mamífero en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de mamífero utilizando una mezcla de 2 oligonucleótidos cebadores según la reivindicación 5.
- 25
12. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de animal vertebrado de origen aviar en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de ave utilizando una mezcla de 2 oligonucleótidos cebadores según la reivindicación 6.
- 30
13. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de diferente origen en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de Planta, Animal o Pescado simultáneamente utilizando una mezcla de 5 oligonucleótidos cebadores, determinados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos según reivindicación 1.
14. Un método según la reivindicación 13 caracterizado porque permite la correcta amplificación de un máximo de 3 amplicones diagnósticos de

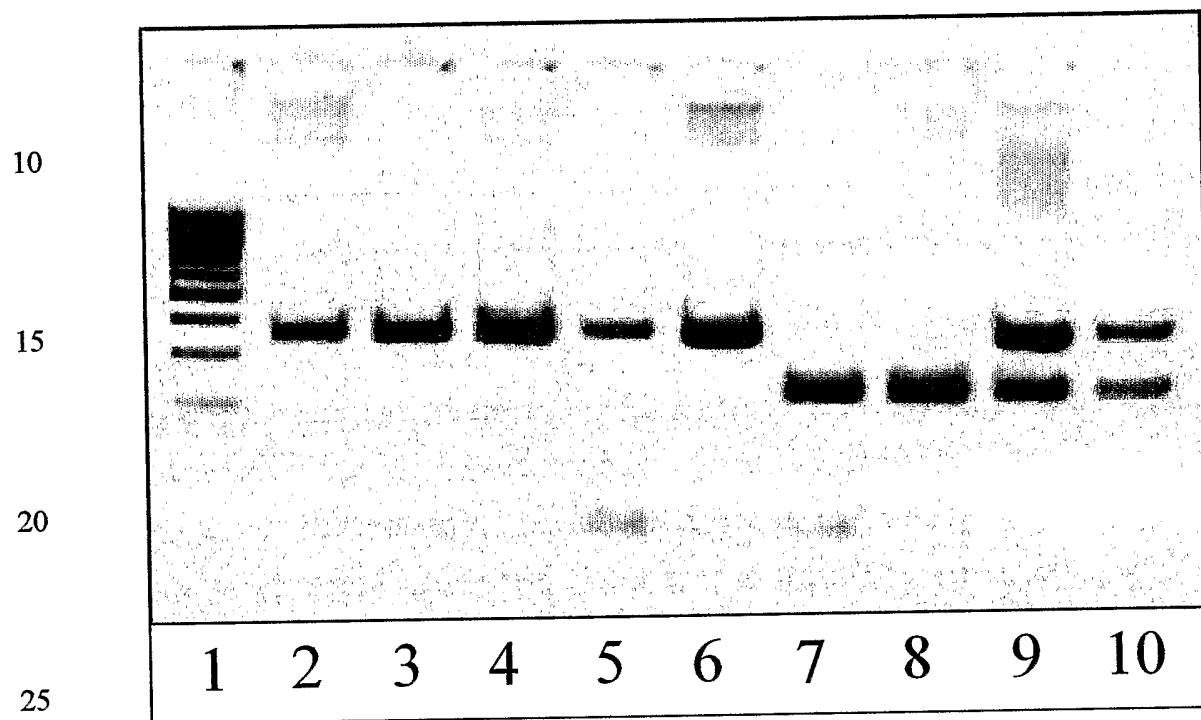
diferente tamaño (120 bp que indica la presencia de pescado, 260 bp que indica la presencia de animal, y 400 bp que indica la presencia de plantas).

- 5 15. Un método según la reivindicación 7, para la detección de ADN de diferente origen en alimentos y piensos compuestos, caracterizado porque se determina la presencia de animal vertebrado de origen aviar o mamífero simultáneamente utilizando una mezcla de 4 oligonucleótidos cebadores, determinados por SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos según reivindicación 1.
- 10 16. Un método según reivindicación 15 caracterizado porque permite la correcta amplificación de un máximo de 2 amplicones diagnósticos de diferente tamaño (220 bp que indica la presencia de animal de origen aviar, 360 bp que indica la presencia de animal mamífero).
- 15 17. El uso de cualquiera de los oligonucleótidos de la reivindicación 1 como cebadores para la detección del origen e identificación del ADN en la composición de cualquier sustancia orgánica.
- 20 18. Kit para determinar e identificar la presencia de ADN de origen vegetal, animal y/o pescado, y diferenciar carnes de mamífero y ave, mediante dos reacciones de PCR múltiple, según las reivindicaciones 2 a 16, caracterizado porque permite la correcta amplificación de un máximo de 3 y 2 amplicones diagnósticos respectivamente de diferente tamaño y diferenciables mediante la electroforesis en gel de agarosa, y porque contiene los oligonucleótidos de ADN determinados por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 ó versiones degeneradas, más cortas o más largas de los mismos según reivindicación 1.
- 25

Figural



20

5 **Figura 2**

Listado de secuencias

<110> Universidad Complutense de Madrid

<120> Identificación de ADN en alimentos crudos o procesados y piensos compuestos

<160> 9

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer for PCR, based on ribosomal 18S gene from plant

<400>

caagaatttc acctctgact atga

24

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer for PCR, based on ribosomal 18S gene from animal

<400>

ctctaatttt ttcaaagtaa acgctt

26

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer for PCR, based on rhodopsin gene from fish

<400>

gggtggtctc rgactcctg

19

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer for PCR, based on rhodopsin gene from fish

<400>
gagtccttyg tbrtctacat gttc 24

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer for PCR, based on ribosomal 18S gene from animal and plant

<400>
attggagggc aagtctggt 19

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer for PCR, based on ribosomal 12S gene from mammals

<400>
atccaagcac actttccagt atg 23

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer for PCR, based on ribosomal 12S gene from mammals

<400>
tatataccgc catcttcagc aa 22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer for PCR, based on ribosomal 12S gene from bird

<400>

ggctatacct tgacctgtct

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer for PCR, based on ribosomal 12S gene from bird

<400>

ctgagaacta cgagcacaaa c

21