



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 502**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03758145 .1**

86 Fecha de presentación : **27.10.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1693464**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Método para la identificación de especies biológicas.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es:  
**Laboratorios Dr.F. Echevarne, Análisis, S.A.**  
**c/ Provenza, nº 312 - Bajos**  
**08037 Barcelona, ES**

72 Inventor/es: **Isamat Riviere, Marcos**

74 Agente: **No consta**

ES 2 305 502 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

# ES 2 305 502 T3

## DESCRIPCIÓN

Método para la identificación de especies biológicas.

5 La presente solicitud se refiere al campo del análisis taxonómico de muestras biológicas, basado en el uso de la secuencia de ADN de una proteína evolutivamente muy conservada.

### Técnica anterior

10 El análisis taxonómico de muestras es aplicable a un amplio espectro de industrias y actividades. Las tres áreas principales de aplicación del análisis taxonómico son:

#### *Análisis de productos alimenticios y control de cadenas de producción de alimentos*

15 La demanda de pruebas que proporcionen la trazabilidad del origen taxonómico de muestras biológicas o de productos alimenticios se ha incrementado desde la crisis en el sector alimenticio desencadenada por el brote epidemiológico de la encefalopatía espongiforme bovina en el Reino Unido y la tendencia creciente a mezclar ilegalmente carnes de diferentes orígenes taxonómicos, sin etiquetar en consecuencia el producto final. Por ejemplo, se ha descrito que se ha añadido sistemáticamente carne de origen bovino a productos avícolas importados desde todo el mundo a Holanda y posteriormente distribuidos por toda Europa. También se ha informado de otras formas de adulteración y se cree que la práctica puede estar ampliamente extendida en industrias de este sector. No obstante, esto es difícil de detectar sin desarrollar técnicas avanzadas basadas en el análisis de ADN.

25 Las pruebas de seguridad en productos alimenticios normalmente se llevan a cabo en laboratorios del gobierno, plantas de procesamiento de alimentos y compañías de servicios asociadas a estas industrias. Actualmente, los usuarios de este sector buscan cada vez más procedimientos de control en respuesta a las demandas crecientes de los clientes. A este aspecto, ciertas cadenas de supermercados han establecido asociaciones con firmas tecnológicas para desarrollar procedimientos de rastreo del origen taxonómico de productos cárnicos usando técnicas genéticas.

30 En una solicitud relacionada, el análisis de alimentos para animales es una de las prioridades de la Agenda agrícola europea, particularmente después de la crisis de las “vacas locas” que concierne a los alimentos para animales. El análisis de productos alimenticios es muy deseable y podría ser obligatorio en un futuro cercano. Los procedimientos de control actualmente están basados en el mantenimiento de registros pero estos no cubren las prácticas de adulteración ilegal o diluciones que se llevan a cabo indiscriminadamente en muchas partes del mundo.

#### *Control y vigilancia de la biodiversidad*

40 La biodiversidad es el resultado de las interacciones entre la historia filogenética de la vida en la Tierra y los procesos evolutivos. Como tal, la biodiversidad es la suma de toda la vida en la tierra e incluye la diversidad genética y funcional y la diversidad de especies.

45 Una de las primeras etapas en los programas de control de la biodiversidad es la recopilación de un inventario taxonómico, especificando todos los taxones, y su sistematización en un ecosistema específico que incluye animales, plantas y microorganismos. Estos inventarios proporcionan la base de control de la biodiversidad y de los programas de conservación. La biodiversidad global es extremadamente vasta: hasta ahora se han descrito 52.629 especies diferentes de vertebrados, 4,63 millones de especies de invertebrados y 265.876 especies de plantas y hongos (cifras tomadas de la Lista roja).

50 El ADN se acepta cada vez más como medio de control de la biodiversidad. Por ejemplo, el ADN obtenido del pelaje encontrado en los bosques canadienses en 2002 se usó para confirmar que aún existe el lince salvaje en la región de los grandes lagos.

#### *Control y vigilancia de especies en peligro de extinción*

55 Actualmente hay aproximadamente 8000 especies de animales y plantas en las listas oficiales de especies en peligro de extinción, y este número aumenta cada año. Esta tendencia apunta a la necesidad de pruebas directas usables “universalmente” para la identificación del origen taxonómico de muestras biológicas.

60 El comercio de productos procedentes de especies en peligro de extinción está controlado por la Convención para el comercio internacional de especies de fauna y flora salvaje en peligro de extinción (CITES) y actualmente se están desarrollando pruebas de ADN bajo el patrocinio de esta organización para controlar este comercio ilegal. Es particularmente importante ser capaz de detectar productos de animales o plantas procesados, tales como productos alimenticios o cosméticos, más que materiales en bruto derivados de animales tales como pieles, que no requieren pruebas de ADN para su identificación. Un ejemplo de esto es el uso de dientes de tigre pulverizados, que se usan en medicinas tradicionales, a pesar de que se ha declarado que la supervivencia de la especie está en grave peligro.

## ES 2 305 502 T3

Las pruebas de ADN se han usado para identificar el material procedente de tigres basándose en la secuencia genética del citocromo b en ADN amplificado y se han descrito pruebas similares para localizar carne de ballena procedente de grupos protegidos en productos procesados que aparentemente contienen carne de ballena “legal”. Se han aplicado soluciones similares para proteger orquídeas, serpientes y cocodrilos en productos destinados al consumo humano y el origen de caviar procedente de esturiones protegidos, etc. Es muy probable que el uso de este tipo de tecnologías para el control de especies en peligro de extinción esté mucho más extendido en un futuro próximo.

### *Tecnología aplicada al análisis taxonómico de muestras*

La metodología usada para determinar el origen animal de muestras biológicas procede principalmente de la industria alimenticia y del sector de productos cárnicos. Desde los procedimientos tradicionales basados en el análisis electroforético y/o inmunoquímico de proteínas, la tecnología ha progresado hacia el análisis del contenido en ADN de muestras alimenticias para identificar inequívocamente la naturaleza del producto. Estos procedimientos identifican los ácidos nucleicos mediante la hibridación de sondas específicas para una especie específica y/o la amplificación selectiva de las secuencias diana usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación hace diana en segmentos de ADN mitocondrial (véase Bartlett y col. *BioTechniques* 1992 vol. 12 págs. 408-411; Unsel y col. *Genome Research* 1995 vol. 4 págs. 241-243; Palumbi y col. *J. Hered.* 1998 vol. 89 págs. 459-464; Wolf y col. *J. Agricult. and Food Chem.* 1999 vol. 47 págs. 1350-1355; Partis y col. *Meat Science* 2000 vol. 54 págs. 369-376). Este procedimiento no es adecuado para determinar muestras con un origen taxonómico doble o heterogéneo. La amplificación también hace diana en el ADN nuclear (véase Janssen y col. *J. Ind. Microbiol. and Biotech.* 1998 vol. 21 págs. 115-120, Matsunaga y col. *Meat Science* 1999 vol. 51 págs. 143-148; Wolf y Lüthy, *Meat Science* 2001 vol. 57 págs. 161-168). Algunas de las proteínas más importantes han sido la topoisomerasa de ADN de tipo II (véase Pat. de EE.UU. N° 5.645.994) y la actina a-cardiaca (véase Bartlett y col. *Meat Science* 1998 vol. 50 págs. 105-114; Fairbrother y col. *Animal Biotech.* 1998 vol. 9 págs. 89-100; Lockley y Bardsley, *Meat Science* 2002 vol. 61 págs. 163-168).

Algunos procedimientos se basan en una PCR en la que un cebador de oligonucleótidos es genérico y el otro depende de la especie a identificar, lo que tiene utilidad en la identificación de especies cárnicas consumidas de forma generalizada (véase Matsunaga y col. *Meat Science* 1999 vol. 51 págs. 143-148). Se han diseñado otros procedimientos para confirmar la presencia de ADN procedente de especies porcinas (véase Montiel-Sosa y col. *J. Agric. Food Chem.* 2000 vol. 48 págs. 2829-2832), bovinas, de avestruces y emús (véase Colombo y col. *Meat Science* 2000 vol. 56 págs. 15-17) en muestras biológicas, pero el problema surge cuando su presencia fracasa en ser confirmada, puesto que esta tecnología no proporciona datos de la identidad taxonómica de la muestra analizada.

El documento más cercano a la presente invención es la patente de EE.UU. 5.645.994, que describe un procedimiento para amplificar selectivamente segmentos de ADN de uno o más organismos en una muestra mediante el uso de secuencias génicas de topoisomerasa de ADN de tipo II.

No obstante, actualmente, todos estos procedimientos son de uso limitado cuando la muestra comprende una mezcla de organismos. Sólo confirmaría la presencia de un organismo conocido previamente o de un organismo sospechoso y no sería posible identificar cada uno de los organismos presentes en la muestra.

Es deseable encontrar un modo de identificar una pluralidad de organismos en una sola muestra sin tener que usar múltiples sondas y sin un conocimiento previo de los organismos que pudieran estar presentes. Otro aspecto que se podría mejorar es la capacidad de distinguir especies muy similares o interrelacionadas.

La presente solicitud pertenece al análisis taxonómico de muestras que comprende la amplificación del gen de la beta-actina citoplasmática. La estructura molecular del gen de la beta-actina citoplasmática humana ha sido descrita por Nakajima-ijima (*PNAS*, vol. 22, n° 18, 1985, págs. 6133-37).

### **Definiciones**

Las siguientes definiciones se proporcionan para los propósitos de la presente descripción:

Proteína ubicua: proteínas con estructura y función similares que están presentes en muchos o en todos los organismos. Una proteína con estas características será igual que la proteína equivalente del resto de las especies.

Segmento conservado: usado para referirse a segmentos de aminoácidos y segmentos de nucleótidos. Segmentos presentes que son sustancial o completamente comunes a las diferentes especies. El “alto” grado de conservación indica que la proporción de segmentos que tienen en común las diversas especies es elevada. Esto se denomina secuencia consenso.

Segmento divergente: usado para referirse tanto a segmentos de aminoácidos como segmentos de nucleótidos. Segmentos presentes que son sustancialmente diferentes entre especies diferentes. En este documento el término “diana” también se usará para referirse a estas secuencias.

**Explicación de la invención**

La presente solicitud soluciona muchas de las limitaciones anteriormente mencionadas. En este aspecto, los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que el gen que codifica la proteína beta-actina citoplasmática y sus productos derivados se puede aplicar a la identificación taxonómica usando muestras de material biológico que procede de una sola especie o de una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies.

La presente invención proporciona un procedimiento para la identificación de especies y subespecies en una muestra biológica que procede de una sola especie o de una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies, por medio de la amplificación selectiva de segmentos de ácidos nucleicos que codifican una región diana de una macromolécula presente en todos los organismos implicados, por lo que, según un primer aspecto, el objeto de la presente invención es un procedimiento que comprende una etapa en la que se extrae ADN de la muestra; una etapa donde se amplifican segmentos génicos de beta-actina citoplasmática mediante PCR o una técnica equivalente con pares de cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo de pares de cebadores de oligonucleótidos constituidos por: P1 y P2; P3 y P4; P5 y P6; y P7 y P8; y una etapa donde el segmento amplificado se identifica comparando su tamaño en pares de bases con un patrón de un tamaño pre-establecido y/o identificando el segmento amplificado por secuenciación de ADN y la comparación de la secuencia resultante con la secuencia específica de cada una de las especies o subespecies presentes en una base de datos.

La etapa donde se amplifica el ADN de partida no está restringida al uso de la PCR; es posible usar cualquier técnica equivalente que se pueda llevar a cabo por una persona experta en la materia usando las herramientas disponibles actualmente. Asimismo, por ejemplo, a la vista de los resultados la PCR no está restringida al uso de electroforesis en gel de agarosa; también es posible usar electroforesis capilar, una electroforesis automatizada o cualquier técnica equivalente con una resolución mínima que sea suficiente para llevar a cabo con éxito el experimento.

Las regiones a amplificar son segmentos génicos divergentes procedentes del gen de la beta-actina citoplasmática con secuencias de ADN con una conservación evolutiva elevada entre especies y subespecies. Y más particularmente, las regiones a amplificar son aquellas que están entre la secuencia 3' del exón aguas arriba y la secuencia 5' del exón aguas abajo que comprenden la secuencia intrónica completa y parte de las secuencias exónicas flanqueantes.

Las regiones a amplificar son aquellas que están entre las posiciones 1130-1473, 1452-2063, 2438-2680 y/o 2642-2960 (numeración en relación con la secuencia de ADN del locus humano HUMACCYBB con número de acceso M10277 Genbank). En particular, las muestras consisten en tejido animal, más específicamente tejido de caballo, cabra, conejo, perro, gato, chimpancé, humano y/u oso pardo. En otra forma de realización, las muestras consisten en tejido de plantas.

En otra forma de realización particular de este procedimiento, en la etapa de identificación, el segmento o segmentos amplificados se comparan con la secuencia humana M10277 y/o con las secuencias de estas mismas regiones génicas de especies incluidas en una base de datos. Los segmentos amplificados muestran las áreas conservadas en los extremos de cada segmento amplificado y la divergencia en la región central correspondiente mayormente a la región intrónica del gen.

La presente invención proporciona el medio de identificación de una pluralidad de organismos en una sola muestra sin tener que usar múltiples sondas que sean específicas para cada una de las especies y subespecies que pudieran estar presentes en la muestra. El procedimiento usa cebadores universales, que son válidos para identificar cualquier especie o subespecie presente en la muestra sin conocimiento previo de los organismos que pudieran estar presentes. Según la invención, se usa una composición de cebadores universales, que se hibridan con las regiones conservadas del gen de la beta-actina citoplasmática, preferentemente 5 con las secuencias que están entre las posiciones 130-1191 y 1453-1473; 1453-1473 y 2041-2065; 2433-2459 y 2643-2680 y/o 2643-2680 y 2940-2960 (numeración en relación con la secuencia de ADN del locus humano HUMACCYBB con número de acceso M10277). Los pares particulares de cebadores universales usados son P1 (1132-1151) 5TCCGGCATGTG-CAAGGCCGG3' y P2 (1474-1454) 5'CTCCATGTCGTCCTCCAGTTGG3'; P3 (1453-1484) 5'ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC3' y P4 (2063-2034) 5TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC3', P5 (2434-2463) 5TGOOCTGAGGCCCTTCCAGCCTTCCTTC3' Y P6 (2681-2643) 5'GGGTACATGGTGGTGCCGCCA GACAGCACNGTGTGGC3'; y P7 (2643-2681) 5'GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACC C3' y P8 (2952-2932) D 5TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG3'.

Según un segundo aspecto, otro objeto de la presente invención es el uso de secuencias de ADN del gen de la beta-actina citoplasmática en muestras biológicas que proceden de una sola especie o de una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies, obtenidas mediante PCR con pares de cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo constituido por: P1 y P2; P3 y P4; P5 y P6; y P7 y P8; para identificar las especies biológicas a las cuales pertenecen las muestras.

La proteína beta-actina citoplasmática cumple con una serie de criterios para conseguir una identificación fiable. Es una proteína ubicua en todos los organismos implicados. La beta-actina citoplasmática es una de las seis isoformas diferentes de la actina identificadas hasta ahora. Específicamente, la beta-actina citoplasmática es una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares. Su función es permitir la movilidad y proporcionar estructura e integridad a la célula, siendo un componente mayoritario del aparato contráctil celular. Por esta razón, es una proteína fundamental para la

supervivencia de la célula, lo que significa que presenta segmentos exónicos con una elevada conservación evolutiva entre especies. El grado de equivalencia en su secuencia de aminoácidos entre especies está entre el 98% y el 100%, suficiente para presentar segmentos muy conservados pero también segmentos divergentes en las partes no codificantes del gen para distinguir correctamente entre especies que están muy relacionadas entre sí. La divergencia de nucleótidos correspondientes, por ejemplo, al intrón B de las especies estudiadas (1216-1347 pb, numeración en relación con la secuencia de ADN del locus humano HUMACCYBB, número de acceso M10277) es inferior al 25%. Los segmentos que están muy conservados entre las diferentes especies y subespecies hacen posible usar cebadores que sean comunes a todas las especies y subespecies, mientras que los segmentos divergentes son objeto de la amplificación usando dichos cebadores, que resulta en un patrón de amplificación diferente para cada una de las especies y subespecies.

Además de la identificación cualitativa de las especies presentes en una muestra desconocida, un aspecto de la presente invención se refiere al análisis cuantitativo de las especies presentes. Esta característica es importante, por ejemplo, en la determinación de los niveles de contaminación de una muestra por un material que procede de otra especie. En muchos casos, un resultado cualitativo será suficiente (por ejemplo, ¿se ha adulterado la carne de pollo usando productos bovinos?), pero en otros casos será necesaria una respuesta cuantitativa (¿cuánto producto bovino se ha añadido a la carne de pollo?). Esto es particularmente importante cuando se aceptan ciertos aditivos dentro de límites específicos.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no implican la exclusión de otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. El resumen de esta solicitud está incluido aquí a modo de referencia.

Para personas expertas en la materia, aparecerán otros objetos, ventajas y características de la invención en parte a partir de la descripción y en parte cuando la invención se lleve a la práctica. Las siguientes formas de realización y figuras particulares se proporcionan a modo de ejemplo ilustrativo no limitante de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama de la estructura del gen de la beta-actina citoplasmática humana. Las cajas representan los exones (exón 1 a 6) y la línea negra continua representa los intrones (I, intrón A a E). Las regiones W, X, Y y Z corresponden a regiones que están dentro de los pares de cebadores P1 y P2, P3 y P4, P5 y P6, y, P7 y P8, respectivamente. Estos fragmentos (W, X, Y y Z) incluyen secuencias de ADN que son divergentes entre diferentes especies biológicas y se pueden amplificar usando PCR usando los cebadores P1 a P8 como se muestra en la Figura 2.

La Figura 2 muestra los detalles de los cebadores de oligonucleótidos mostrados en la Figura 1. La numeración corresponde a su posición en la secuencia del genoma del gen de la beta-actina humana (número de acceso, Genebank: M10277; Locus: HUMACCYBB). A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina. N: posición con degeneración de nucleótido.

Figura 3 Parte superior de la Figura: muestra la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína beta-actina citoplasmática de tres especies diferentes, *Homo sapiens* (hombre), *Mus musculus* (ratón) y *Caenorhabditis elegans* (nematodo). El alineamiento entre estas secuencias muestra el alto grado de conservación de la proteína beta-actina citoplasmática entre especies. Los asteriscos indican una equivalencia del 100% en esa posición entre las especies comparadas. La numeración corresponde al último aminoácido mostrado según la secuencia de referencia en el GeneBank (refs: Hs: X00351. Mm: NM - 007393.1. Ce: NM - 073416.1). Mitad de la Figura: especifica la secuencia de nucleótidos de los extremos de los exones 2 y 3 que flanquean al intrón B (región W) en dichas especies. Los exones muestran la secuencia de nucleótidos en las tres especies comparadas, divididos en sus codones correspondientes y el residuo aminoácido que codifican se muestra a continuación. Los asteriscos corresponden a las posiciones de los nucleótidos que están conservadas un 100% entre las especies comparadas. Parte inferior de la Figura: especifica la secuencia de nucleótidos completa del intrón B (región W divergente) en las tres especies comparadas, para ilustrar la divergencia usada para la identificación de las especies en esta invención.

La Figura 4 muestra un diagrama que ilustra el proceso de identificación taxonómica propuesto en esta invención, usando una mezcla biológicamente heterogénea. La muestra biológica se procesa para extraer el ADN y someterlo a amplificación por PCR. En el caso que se ilustra aquí, se amplifica la región W con los cebadores P1 y P2. El resultado de la PCR se visualiza usando electroforesis normal en gel de agarosa (véase gel de electroforesis, hilera a la izquierda: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb. Hilera a la derecha: bandas (A y B, con un peso molecular aproximado expresado en pares de bases, pb, que resulta de la PCR de la muestra biológica). Las bandas se aíslan del gel y se purifican antes de someterlas a secuenciación de ADN mediante procedimientos normales. Las secuencias de ADN obtenidas a partir de cada una de las bandas se usan para interrogar una base de datos que incluye las secuencias de la región W de especies biológicas. La comparación de las secuencias obtenidas usando las secuencias existentes en la base de datos da el resultado de la identificación de la especie (o especies) contenida en la muestra biológica de origen.

La Figura 5 muestra un diagrama de flujo que ilustra el proceso computerizado para la identificación de las especies contenidas en una muestra biológica sometida a análisis. Las secuencias de ADN obtenidas a partir de los dos fragmentos de la región W en el experimento mostrado en la Figura 4 se usan para interrogar una base de datos de se-

## ES 2 305 502 T3

cuencias de ADN de la región W en especies específicas. La base de datos mostrada en este caso se resume y contiene 11 especies diferentes a modo de ejemplo (Secuencia 3: Cf, *Canis familiaris*, perro. Secuencia 4: Us, *Ursus species*, oso. Secuencia 5: Oa, *Ovis aries*, cabra. Secuencia 6: Fc, *Felis catus*, gato. Secuencia 7: Hs, *Homo sapiens*, hombre. Secuencia 8: Ec, *Equus caballus*, caballo. Secuencia 9: Oc, *Oryctolagus cuniculus*, conejo. Secuencia 10: Rn, *Rattus norvegicus*, rata. Secuencia 11: Mm, *Mus musculus*, ratón. Secuencia 12: Dm, *Drosophila melanogaster*, mosca del vinagre. Secuencia 13: Ce, *Caenorhabditis elegans*, nematodo). Las comparaciones resultantes con una equivalencia del 100%, que en este caso son 1:5 y 2:8, presentan una identidad con las secuencias incluidas en la base de datos y confirman que la muestra biológica de origen procede de una mezcla de cabra y caballo.

10 La Figura 6 muestra una ilustración de la divergencia en el peso molecular y en la secuencia de nucleótidos de la región W de parte de las especies biológicas incluidas en la base de datos. Us, *Ursus species*. Oa, *Ovis aries*. Cf, *Canis familiaris*. Hs, *Homo sapiens*. Ec, *Equus caballus*. Oc, *Oryctolagus cuniculus*. Rn, *Rattus norvegicus*. Mm, *Mus musculus*.

15 La Figura 7 muestra un ejemplo experimental de una electroforesis en gel de agarosa correspondiente a 10 ampli-  
caciones separadas por PCR de la región W que está entre los cebadores P1 y P2 de sangre periférica de ocho especies  
diferentes de animales. Los números a cada lado indican el peso molecular aproximado, expresado en pares de bases  
(pb), obtenido para la región W en cada una de las ampliificaciones. Es posible observar la diferencia en el peso mo-  
lecular de esta región entre las especies animales incluidas. Oc: *Oryctolagus cuniculus*, conejo. Cf: *Canis familiares*,  
20 perro. Fc: *Felis catus*, gato. Us: *Ursus species*, oso. Ec: *Equus caballus*, caballo. Pt: *Pan troglodytes*, chimpancé. Oa:  
*Ovis aries*, cabra. Hs: *Homo sapiens*, hombre. Las hileras a la izquierda del gel corresponden a la escalera patrón de  
pesos moleculares de 100 pb (Invitrogen). En este patrón, la banda más baja corresponde a 100 pb y a medida que  
ascienden, cada banda es 100 pb mayor que la inmediatamente por debajo de ella.

### 25 Descripción detallada de formas de realización concretas

#### *Identificación de una especie usando una muestra biológica homogénea/heterogénea*

30 El procedimiento desarrollado para la identificación taxonómica de una muestra biológica heterogénea de compo-  
sición desconocida se describe a continuación. El procedimiento sería el mismo para una muestra homogénea, puesto  
que siempre se presume que no se conoce absolutamente nada sobre el número de especies y/o subespecies diferentes  
presentes o sobre la naturaleza taxonómica misma.

#### 35 *Procesamiento de la muestra*

Se extrajo ADN genómico a partir de una muestra de 200  $\mu$ l de sangre completa venosa en EDTA, que era compa-  
tible con cualquier kit comercial para la extracción rápida de ADN, para su posterior ampliación por PCR.

40 El ADN genómico obtenido a continuación se amplificó por PCR. La región W (Figura 1) se amplificó con los  
cebadores diseñados frente a las posiciones de los nucleótidos 1132-1151 (P1, cebador de sentido directo directo,  
5'TCCGGCATGTGCAAGGCCGG3' y 1474-1454 (P2, cebador de sentido directo opuesto, 5'CTCCATGTCGTCC  
CAGTTGG3'), de acuerdo con la secuencia M10277 humana. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: reac-  
tivos habituales, etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguido por 35 ciclos de dos etapas cada  
45 una a 94°C durante 10 segundos y 68°C durante 2 minutos.

#### *Primera aproximación: identificación mediante el peso molecular*

50 El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal normal al 3% en tampón  
TBE. Las bandas obtenidas se compararon con un marcador de pesos moleculares patrón de 100 pb de Invitrogen. La  
Figura 4 muestra los resultados obtenidos. La comparación de la movilidad de los fragmentos ampliificados en el gel  
usando el marcador de pesos moleculares muestra un peso molecular de 371 y 304 pares de bases aproximadamente. Si  
55 los pesos moleculares de las bandas obtenidas se comparan con una base de datos de tamaños moleculares obtenidos  
a priori, es posible realizar una primera aproximación en la identificación de las especies presentes en la muestra  
de partida. La Figura 7 muestra un grupo de 10 ampliificaciones separadas por PCR de la región W que está entre  
los cebadores P1 y P2 de sangre periférica procedente de ocho especies de animales diferentes. Es posible observar  
la diferencia en el peso molecular de esta región entre las especies animales incluidas. Oc: *Oryctolagus cuniculus*,  
60 conejo. Cf: *Canis familiaris*, perro. Fc: *Felis catus*, gato. Us: *Ursus species*, oso. Ec: *Equus caballus*, caballo. Pt:  
*Pan troglodytes*, chimpancé. Oa: *Ovis aries*, cabra. Hs: *Homo sapiens*, hombre. Las hileras a la izquierda del gel  
corresponden a la escalera patrón de pesos moleculares de 100 pb (Invitrogen). En una primera aproximación por  
comparación con esta base de datos de pesos moleculares, las bandas obtenidas en la Figura 4 corresponderían a cabra  
(banda de 371 pb) y caballo (banda de 304 pb).

65

## ES 2 305 502 T3

### *Segunda aproximación: identificación mediante secuenciación de ADN*

A continuación, una segunda aproximación identifica las dos bandas obtenidas por secuenciación de su ADN. Las bandas se purificaron usando el kit Concert Rapid PCR Purification System de Life Technologies, de manera que a continuación se pudo secuenciar su ADN. La secuenciación se llevó a cabo cíclicamente en ambas direcciones con los mismos cebadores usados en la PCR inicial de acuerdo con los protocolos y reactivos del sistema de secuenciación automático ABI-Prism 310 de Applied Biosystems. Las dos secuencias obtenidas se usaron para interrogar una base de datos de secuencias de ADN de la región W del gen de la beta-actina citoplasmática de diversas especies usando el programa ClustalW desarrollado por el European Bioinformatic Institute del EMBL ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) o un programa equivalente que está disponible en Internet (Figura 5). Las comparaciones dieron como resultado una equivalencia del 100% de 1:5 y 2:8 en este caso, confirmando la fuente de la muestra biológica de origen, una mezcla de cabra y caballo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la identificación de especies biológicas usando muestras de material biológico procedente de una sola especie o de una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies, **caracterizado** porque comprende: (A) extracción de ADN de la muestra; (B) amplificación de segmentos del gen de la beta-actina citoplasmática, con pares de cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo de pares de cebadores de oligonucleótidos constituido por:

P1 sentido directo (1132-1151) 5'TCCGGCATGTGCAAGGCCGG3', y  
P2 sentido opuesto (1474-1454) 5'CTCCATGTTCGTCCTCCAGTTGG3';

P3 sentido directo (1453-1484)  
5'ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC3', y

P4 sentido opuesto (2063-2034) 5'TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC3';

P5 sentido directo (2434-2463) 5'TGCCCTGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTC3',  
y

P6 sentido opuesto (2681-2643)  
5'GGGTACATGGTGGTGCCGCCAGACAGCACNGTGTGGC3';

y  
P7 sentido directo (2643-2681)

5'GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCC3' y

P8 sentido opuesto (2952-2932) 5'TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG3';

por PCR o una técnica equivalente; (C) identificación del segmento amplificado por comparación de su tamaño en pares de bases con un patrón de tamaños pre-establecido y/o la identificación del segmento amplificado mediante secuenciación de ADN y la comparación de la secuencia resultante con la secuencia específica de cada especie o subespecie presente en una base de datos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la etapa de amplificación que usa la PCR o una técnica equivalente, se amplifica cualquier segmento del gen de la beta-actina citoplasmática.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en la etapa de amplificación que usa la PCR o una técnica equivalente, los segmentos génicos de las regiones divergentes del gen de la beta-actina citoplasmática se amplifican usando secuencias de ADN con una elevada conservación evolutiva entre especies y subespecies.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en la etapa de amplificación que usa la PCR o una técnica equivalente, los segmentos a amplificar son aquellos que están entre la secuencia 3' del exón sentido directo y la secuencia 5' del exón sentido opuesto que comprenden la secuencia intrónica completa y parte de las secuencias exónicas flanqueantes.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la región o regiones a amplificar se seleccionan del grupo constituido por las regiones que están entre las posiciones 1130-1473, 1452-2063, 2438-2680 y 2642-2960, la numeración en relación a la secuencia de ADN del locus HUMACCYBB humano, número de acceso M10277.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque usa una composición de cebadores universales que se hibridan con las regiones de nucleótidos más altamente conservadas del gen de la beta-actina citoplasmática.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque los cebadores se hibridan con las secuencias que están entre las posiciones 1130-1191 y 1453-1473, la numeración en relación a la secuencia de ADN del locus HUMACCYBB humano, número de acceso M10277.

## ES 2 305 502 T3

8. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque los cebadores se hibridan con la secuencia que está entre las posiciones 1453-1473 y 2041-2065, la numeración en relación a la secuencia de ADN del locus HUMACCYBB humano, número de acceso M10277.

5 9. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque los cebadores se hibridan con la secuencia que está entre las posiciones 2433-2459 y 2643-2680, la numeración en relación a la secuencia de ADN del locus HUMACCYBB humano, número de acceso M10277.

10 10. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque los cebadores se hibridan con la secuencia que está entre las posiciones 2643-2680 y 2940-2960, la numeración en relación a la secuencia de ADN del locus HUMACCYBB humano, número de acceso M10277.

15 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque las muestras son de origen biológico.

12. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque las muestras se obtienen a partir de tejido de caballo, cabra, conejo, perro, gato, chimpancé, humano y/u oso pardo.

20 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque en la etapa de identificación el segmento(s) amplificado se compara con las secuencias de estas mismas regiones génicas de especies incluidas en una base de datos.

25 14. Uso de secuencias de ADN del gen de la beta-actina citoplasmática en muestras biológicas que proceden de una sola especie o de una mezcla heterogénea de especies y/o subespecies, obtenidas por PCR con pares de cebadores de oligonucleótidos seleccionados del grupo constituido por:

P1 sentido directo (1132-1151) 5'TCCGGCATGTGCAAGGCCGG3', y

30 P2 sentido opuesto (1474-1454) 5'CTCCATGTCTCGTCCCAGTTGG3';

P3 sentido directo (1453-1484)

35 5'ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC3', y

P4 sentido opuesto (2063-2034) 5'TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC3';

40 P5 sentido directo (2434-2463) 5'TGCCCTGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTC3',

y

45 P6 sentido opuesto (2681-2643)

5'GGGTACATGGTGGTGCCGCCAGACAGCACNGTGTTGGC3';

y

50 P7 sentido directo (2643-2681)

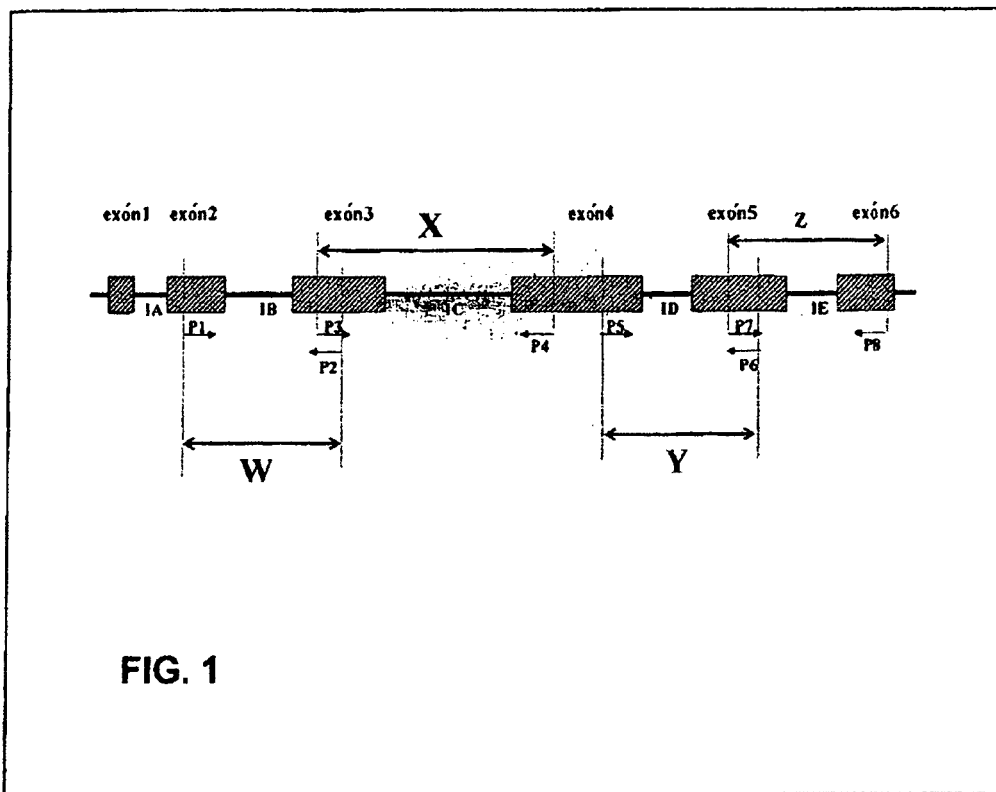
5'GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCC3' y

P8 sentido opuesto (2952-2932) 5'TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG3';

55 para identificar las especies biológicas a las cuales pertenecen las muestras.

60

65



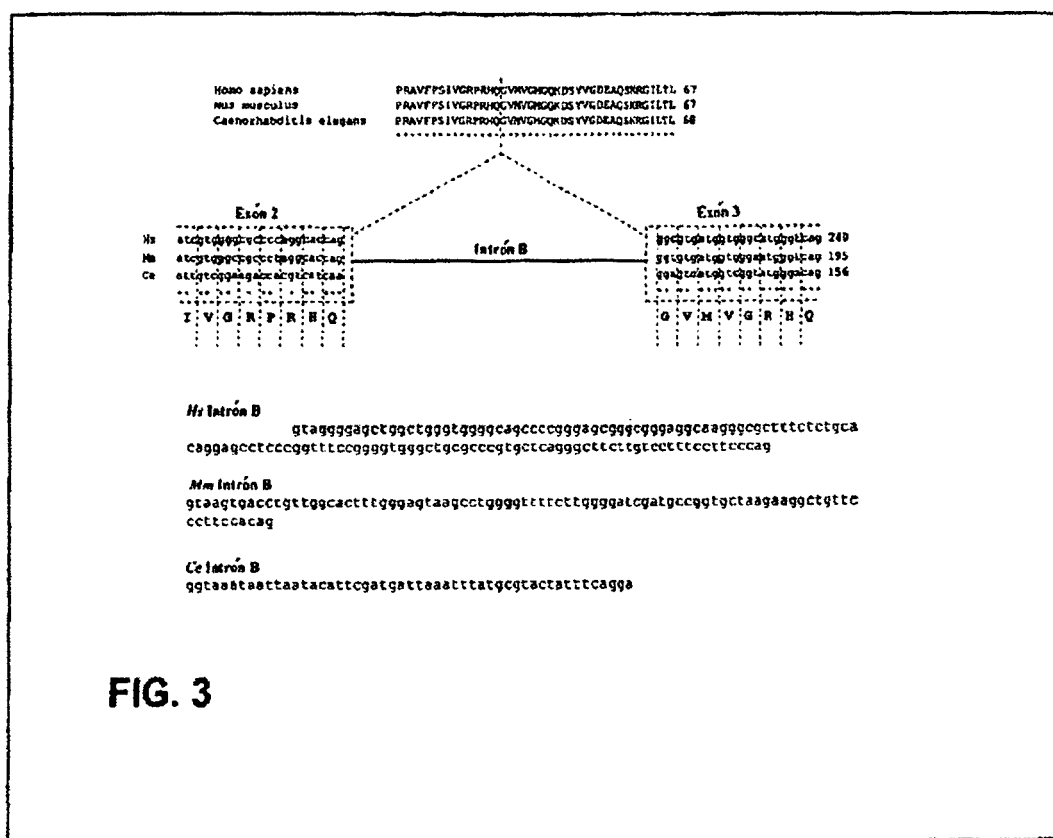
P1 (1132-1151) 5' -TCCGGCATGTGCAAGGCCGG-3'  
P2 (1474-1454) 5' -CTCCATGTCGTCCCAGTTGG-3'

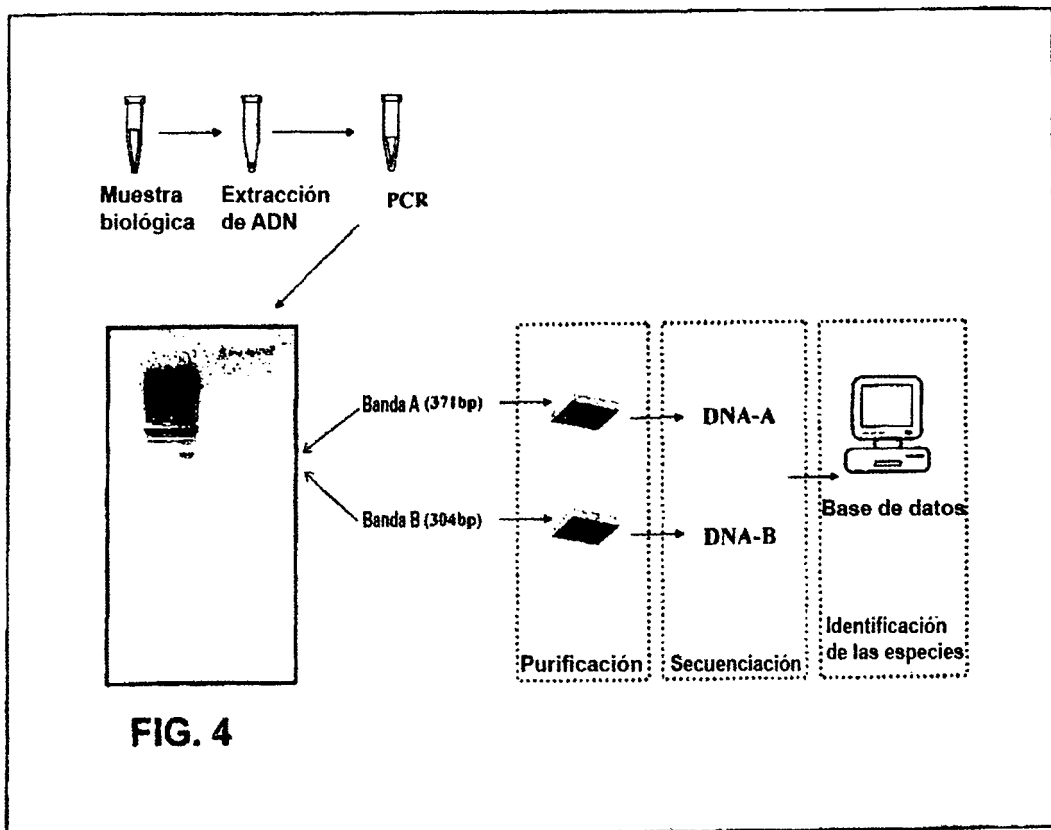
P3 (1453-1484) 5' ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGC 3'  
P4 (2063-2034) 5' TACATGGCNGGGGTGTTAAAGGTCTCAAAC 3'

P5 (2434-2463) 5' TGCCCTGAGGCCCTCTTCCAGCCTTCCTTC 3'  
P6 (2681-2643) 5' GGGTACATGGTGGTGCCGCCAGACAGCACNGTGTGGC 3'

P7 (2643-2681) 5' GCCAACACNGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCC 3'  
P8 (2952-2932) 5' TCGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG 3'

**FIG. 2**





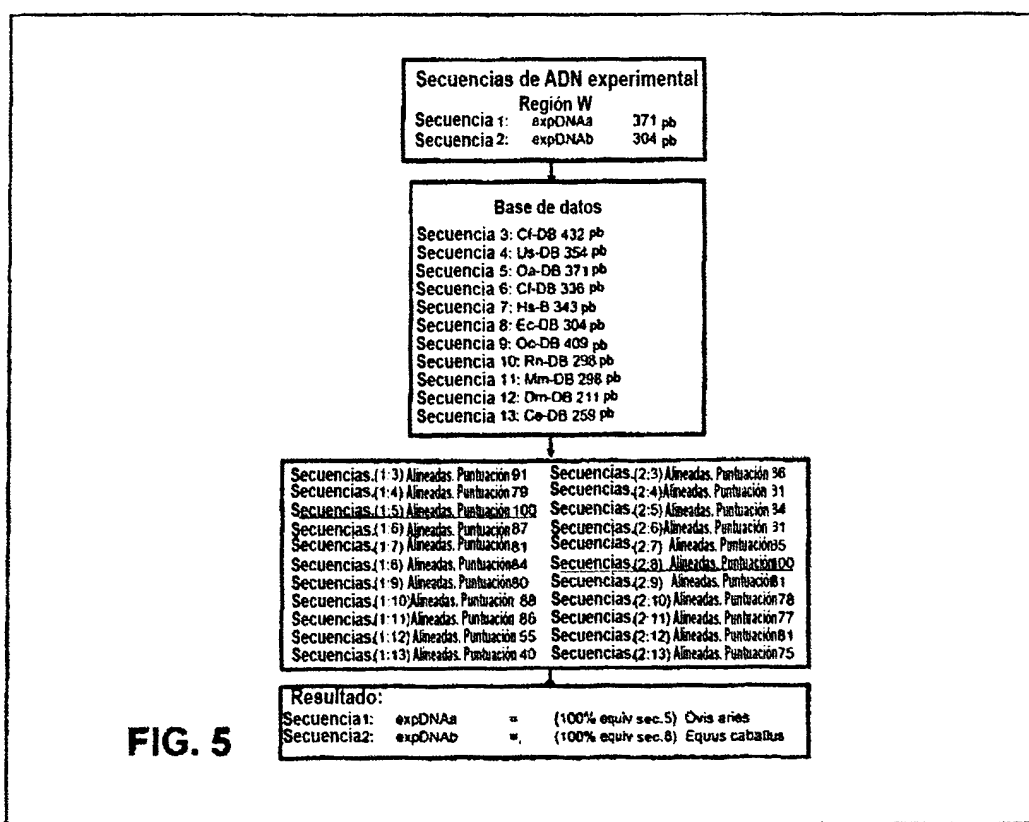
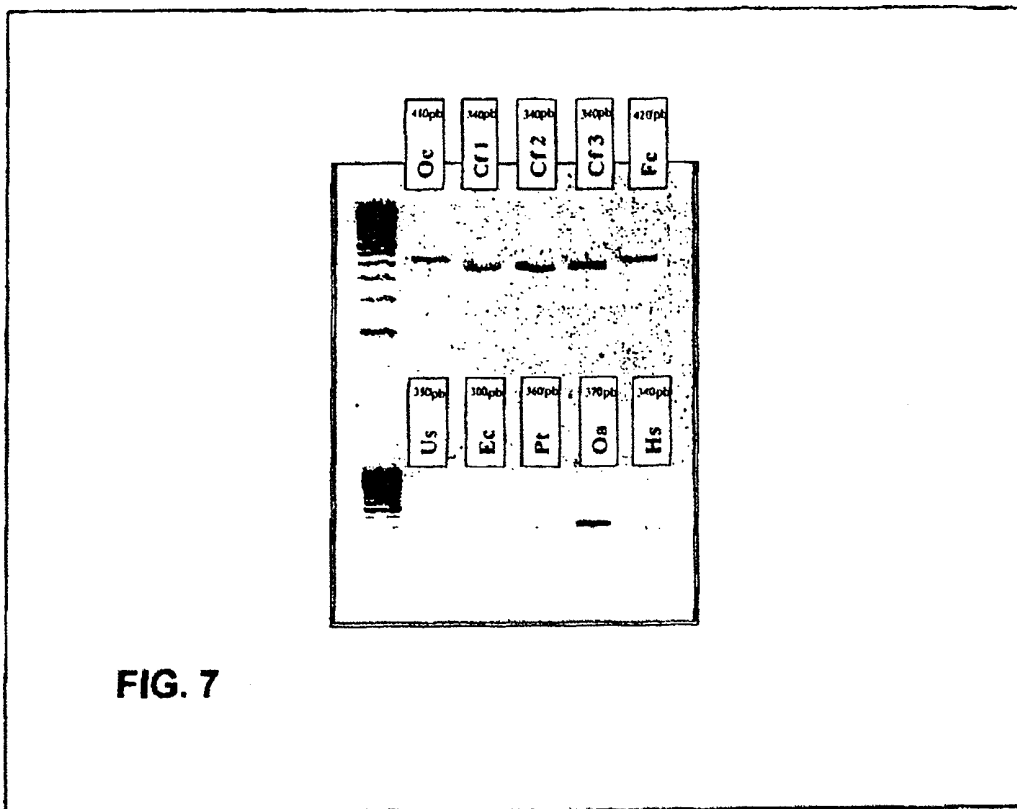


FIG. 5





# ES 2 305 502 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Laboratorios Echevarne	
5	<120> Procedimiento para la identificación de especies biológicas	
	<130> Beta-actina	
	<140> ---	
	<141> 27-10-2003	
10	<160> 8	
	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 1	
	tccggcatgt gcaaggccgg	20
25	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 2	
	ctccatgtcg tcccagttgg	20
35	<210> 3	
	<211> 31	
	<212> ADN	
40	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
45	accaactggg acgacatgga gaagatctgg c	31
	<210> 4	
	<211> 30	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
55	<222> (9)..(9)	
	<223> "n" significa cualquier nucleótido	
60	<400> 4	
	tacatggcng ggggtgtaaa ggtctcaaac	30
65	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	

## ES 2 305 502 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
5	tgccctgagg ccctctcca gccttcctc	30
	<210> 6	
10	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (30) . . (30)	
	<223> “n” significa cualquier nucleótido	
20	<400> 6	
	gggtacatgg tggcgccgcc agacagcacn gtgtggc	38
25	<210> 7	
	<211> 38	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(9)	
35	<223> “n” significa cualquier nucleótido	
	<400> 7	
40	gccaacacng tgctgtctgg cggcaccacc atgtacc	38
	<210> 8	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
50	tcgtactct gcttgctgat ccacatctg	29
55		
60		
65		

## ES 2 305 502 T3

Según la solicitud de patente titulada:

Procedimiento para la identificación de especies biológicas

5 Con fecha de solicitud de 27 de octubre de 2003, y con el N° de solicitud PCT/ES03/00547.

Junto a ella se adjuntan las secuencias de los cebadores incluidos en dicha solicitud.

10 Debido a la imposibilidad de modificar el texto original de la solicitud de patente, también se adjunta una tabla explicativa de equivalencias entre la identificación de las secuencias de cebadores en el texto de patente y el listado de secuencias.

Id. en el texto de patente	Id. en el listado de secuencias (Campo <210>)
P1	ID de SEC. N°: 1
P2	ID de SEC. N°: 2
P3	ID de SEC. N°: 3
P4	ID de SEC. N°: 4
P5	ID de SEC. N°: 5
P6	ID de SEC. N°: 6
P7	ID de SEC. N°: 7
P8	ID de SEC. N°: 8

35

40

45

50

55

60

65