



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 303 460**

② Número de solicitud: 200603193

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **12.12.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2008**

Fecha de la concesión: **15.04.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

⑰ Titular/es: **Universidade da Coruña
OTRI - Servicios Centrales de Investigación
15071 A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Méndez Felpeto, Josefina;
Fernández Tajés, Juan y
García Gil, José Baldomero**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la identificación de las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* mediante PCR y análisis RFLP del espaciador del ADN ribosómico 5S.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la identificación de las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* mediante PCR y análisis RFLP del espaciador del ADN ribosómico 5S.

Se establece un procedimiento para la identificación de las navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* basado en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN ribosómico 5S y posterior digestión con una enzima de restricción. Las tres especies de navajas se distinguen por el patrón de digestión generado por la enzima de restricción BaeIII: en *E. arcuatus* se obtienen fragmentos de aproximadamente 26, 120 y 270 pares de bases (pb), en *E. siliqua* de 26 y 400 pb y en *E. directus* se obtienen fragmentos de 24, 205 y 215 pb. Las diferencias de tamaño de los fragmentos más grandes de cada especie son apreciables en un gel estándar de agarosa al 2%, permitiendo reconocer sin dificultad cada especie. El procedimiento desarrollado no depende del ciclo vital de los organismos y es válido para productos manufacturados, tanto congelados como en conserva.

ES 2 303 460 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la identificación de las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. silicua* y *E. directus* mediante PCR y análisis RFLP del espaciador del ADN ribosómico 5S.

Objeto de la invención

El procedimiento desarrollado constituye un método sencillo basado en el análisis de la secuencia del espaciador no transcrito del ADN ribosómico 5S para identificar las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus*.

Antecedentes de la invención

La identificación de especies en productos de la pesca y de la acuicultura se realiza principalmente en base a características morfológicas, lo cual requiere disponer de los especímenes enteros y de un detallado análisis cuando los ejemplares son muy pequeños. En el caso de productos manufacturados la identificación se ve dificultada o incluso impedida por la pérdida de referencias morfológicas, posibilitando la aparición de fraudes, respecto a la sustitución de unas especies por otras de menos valor.

La explotación de las tres especies se está incrementando enormemente en el mercado, tanto español como europeo. La reciente introducción de *E. directus* originaria de Estados Unidos en los mercados, así como la similitud que existe entre las tres especies ha determinado la necesidad de desarrollar técnicas que permitan la identificación unívoca de las especies comercializadas para garantizar el cumplimiento de las normativas de comercialización vigente y evitar fraudes al consumidor.

Ante la necesidad de garantizar al consumidor un etiquetado correcto, se ha comenzado a aplicar métodos no morfológicos, basados en el análisis de proteínas mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas. Aunque válidos en algunos casos, estos métodos presentan la desventaja de que los perfiles proteicos son tejido dependientes y que los tratamientos térmicos alteran las propiedades de las proteínas. Así, se recurre a métodos basados en el ADN por tratarse de una molécula más resistente y por encontrarse en todos los tejidos.

Los métodos basados en el ADN empleados actualmente para la identificación de especies generalmente hacen uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante el diseño de cebadores apropiados se pueden amplificar directamente tramos de ADN que muestran variantes de longitud o bien amplificar series diferentes de fragmentos. En otros casos, el producto amplificado puede analizarse por varios métodos para detectar polimorfismo. Estos incluyen secuenciación, digestión con enzimas de restricción o análisis SSCP (polimorfismo conformacional de la cadena sencilla). No obstante, a la hora de aplicar cualquier técnica molecular debe tenerse en cuenta que el ADN extraído de productos manufacturados a menudo no excede de unos pocos cientos de pares de bases.

En el caso de las navajas *Ensis arcuatus* (navaja), *E. siliqua* (longueirón) y *E. directus*, a pesar de que se explotan y se manufacturan en diferentes países europeos, no se dispone de ningún criterio no morfológico que permita su identificación en productos manufacturados. La innovación que se presenta utiliza la técnica de PCR para amplificar una región espaciadora localizada entre las regiones codificantes del ARN 5S, denominada espaciador no transcrito (NTS), y posterior digestión con enzimas de restricción.

La ventaja del ARNr 5S como marcador genético se debe a que está presente en todos los eucariotas en múltiples copias que evolucionan de manera concertada, por lo que no presenta dificultades en la amplificación por PCR y, en ausencia de polimorfismo intraespecífico, se comporta como un único locus. Además el tamaño del ARNr 5S en estas navajas es menor de 500 pb, amplificándose fácilmente a partir del ADN degradado, característico de productos manufacturados, especialmente los envasados en conserva.

El procedimiento que se presenta se ha establecido tras una etapa de investigación encaminada a determinar la secuencia nucleotídica de la región ARNr 5S y a evaluar la posible existencia de polimorfismo intraespecífico.

Sumario de la invención

El procedimiento que se presenta permite diferenciar las navajas *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* por el patrón electroforético observado en un gel de agarosa tras la digestión del producto de PCR de la región ARNr 5S con una enzima de restricción. Emplea ADN extraído de ejemplares vivos, conservados en etanol, congelados o envasados en conserva, y la amplificación por PCR se lleva a cabo con el mismo par de cebadores en las tres especies, generando en todas ellas un único fragmento de unas 430 pb. La digestión se realiza con el enzima de restricción *HaeIII* que presenta al menos un sitio de reconocimiento en el ARNr 5S en cada especie, dando lugar a fragmentos de aproximadamente unas 26, 120 y 270 pb en *E. arcuatus*, de 26, 205 y 215 pb en *E. directus* y de 24, 400 pb en *E. siliqua*. Las diferencias de tamaño de los fragmentos más grandes de cada especie se aprecian claramente en un gel estándar de agarosa al 2%, criterio que permite reconocer sin dificultad cada especie.

ES 2 303 460 B1

Descripción detallada de una forma de realización preferida

1.- Extracción de ADN

- 5 Según el método CTAB, seguimos los siguientes pasos:
- Pesar 30 mg de muestra en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml.
 - Añadir 400 μ l de CTAB-buffer y 5 μ l de Proteinasa K (1 mg/ml).
 - 10 - Incubar a 60° durante toda la noche.
 - Añadir 4 μ l de RNAsa (2 mg/ml) e incubar 1 h a 37°C.
 - 15 - Añadir un volumen de 400 μ l de fenol. Lavar 5 minutos en noria.
 - Añadir un volumen de 400 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Lavar 5 minutos en noria.
 - Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos.
 - 20 - Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril.
 - Repetir los pasos 2, 3 y 4 (cloroformo-alcohol isoamílico, lavar, centrifugar y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo).
 - 25 - Añadir un volumen de 1000 μ l de isopropanol frío. Mezclar por inmersión del tubo y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos.
 - Se añade 1000 μ l de etanol 70° frío.
 - 30 - Lavar durante una hora en noria.
 - Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
 - 35 - Secar el ADN y resuspender en 100 μ l de 1xTE (TRIS-EDTA).

2.- Amplificación mediante PCR de la región ribosómica 5S

40 En nuestro caso utilizaremos un único par de cebadores en las tres especies. La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L, conteniendo 25 ng de ADN, 2.5 μ L de *buffer* (con el magnesio incluido), dNTP 200 μ M, 0.2 μ M de cada *primer*, 2U de la enzima *Taq* polimerasa.

45 El protocolo de la PCR se ejecutará de acuerdo con el siguiente protocolo: una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, con un paso final de elongación de 72°C durante 5 minutos.

3.- Digestión de los fragmentos amplificados con la enzima de restricción *HaeIII*

50 El producto de PCR del ADNr 5S se sometió a digestión con la enzima de restricción *HaeIII*. La mezcla de reacción se realizó en volúmenes de 15 μ l, conteniendo 5 μ L de producto de PCR (aproximadamente 80 ng de ADN), 0.5 μ l de enzima (5U de enzima), 1.5 μ L del buffer recomendado para cada enzima y 8 μ l de agua estéril. La mezcla de digestión se incubó en estufa durante toda la noche. La reacción se paró añadiendo 2 μ L de tampón de carga.

4.- Electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos amplificados

55 Se realiza en geles de agarosa al 2%, someténdolo a un voltaje de aproximadamente 3V/cm. durante 6-7 horas. Los fragmentos amplificados se visualizan tras tinción con Bromuro de Etidio bajo iluminación con luz ultravioleta.

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la identificación de las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* mediante PCR y análisis RFLP del espaciador del ADN ribosómico 5S, basado en la amplificación de la región ARNr 5S y posterior digestión con enzimas de restricción.

10 2. Procedimiento para la identificación de las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* mediante PCR y análisis RFLP del espaciador del ADN ribosómico 5S, según la reivindicación 1, basado en la secuencia nucleotídica de la región ARNr 5S.

15 3. Procedimiento para la identificación de las especies de navajas comerciales *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *E. directus* mediante PCR y análisis RFLP del espaciador del ADN ribosómico 5S, según la reivindicación 1, basado en la digestión de la región ARNr 5S con el enzima de restricción *HaeIII* o cualquier otro enzima que muestre sitios de reconocimiento en las especies señaladas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 303 460

② Nº de solicitud: 200603193

③ Fecha de presentación de la solicitud: 12.12.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FREIRE, R. et al. Cerastoderma glaucum 5S ribosomal DNA: characterization of the repeat unit, divergence with respect to Cerastoderma edule, and PCR-RFLPs for the identification of both cockles. Genome. 2005, Vol. 48, páginas 427-429.	1-3
X	LÓPEZ-PIÑON, M.J. et al. Identification of Four Scallop Species Using PCR and Restriction Analysis of the Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region. Marine Biotechnology. 2002, volumen 4 página 495, resumen.	1-3
X	SANTA CLARA, F.J. et al. Development of a Method for the Genetic Identification of Mussel Species Belonging to Mytilus, Perna, Aulacomya, and Other Genera. J. Agric. Food Chem. Julio 2006, Volumen 54, página 8466, figura 3.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 01.07.2008	Examinador I.Rueda Molins	Página 1/1
---	-------------------------------------	----------------------