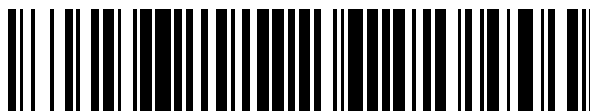


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 585**

51 Int. Cl.:

C12N 15/06 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09748006 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2158314**

54 Título: **Procedimiento para identificar un contenido porcino en un alimento**

30 Prioridad:

26.06.2008 MY 0802327

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA (100.0%)
UPM SERDANG
SELANGOR DARUL EHSAN 43400, MY**

72 Inventor/es:

**B. CHE MAN, YAAKOB;
MUSTAFA, SHUHAIMI;
KHALID, FARIHAH LIYANA;
AZMI , AIDA AZRINA;
SAZILI , AWIS QURNI y
ABDUL RAHIM, RAHA**

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

ES 2 448 585 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).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para identificar un contenido porcino en un alimento.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La invención se refiere a un procedimiento para diseñar cebadores para la identificación de ingredientes alimentarios, especialmente alimento procesado basado en carne. En particular, el procedimiento sirve para identificar la presencia de cerdo (*Sus scrofa*) en un alimento procesado para la autenticación Halal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 [0002] La adulteración de alimentos es una cuestión común a nivel mundial. Por ejemplo, se usaron carnes más baratas como un sustituto para carnes más costosas. Más frecuentemente, se ha usado carne de cerdo para sustituir otros tipos de carne en productos alimentarios. Por lo tanto, la identificación de especies animales, especialmente cerdo en productos alimentarios, se está convirtiendo en una cuestión importante para los consumidores. La incidencia de alteración de la etiquetación de alimentos puede ser mucho más importante con respecto a la presencia de alimento potencialmente no Halal. Por esta razón, se han desarrollado varios procedimientos para identificar la especie de origen de la carne fresca y de los productos cárnicos. Se han empleado en la industria alimentaria numerosos procedimientos basados en análisis de ADN para controlar adulteraciones de los productos alimentarios. Los procedimientos establecidos para especiación animal se basan principalmente en lípidos, proteínas y ADN. Sin embargo, los procedimientos basados en ADN son particularmente más fiables puesto que el ADN es más estable en condiciones asociadas a las altas temperaturas, presiones y tratamiento químico usado en el procesamiento de alimentos.

20 [0003] La identificación de especies de tejidos animales en productos cárnicos es una cuestión importante para proteger al consumidor de la adulteración ilegal o indeseable; por razones económicas, religiosas y de salud. Para este fin, se han desarrollado numerosos procedimientos analíticos basados en análisis de proteínas y ADN. Entre los procedimientos basados en ADN, que se desarrollan en gran medida para la identificación de especies están PCR convencional específica de la especie y PCR en tiempo real. Entre los fragmentos génicos diana desarrollados para PCR específica de especie de cerdo están aquellos obtenidos a partir de 12S de ARNr ND5, bucle de desplazamiento mitocondrial (D-Loop) y el receptor 1 de Melanocortina Nuclear (MCIR).

25 [0004] Aunque se demostró que el procedimiento que utiliza PCR convencional fue un éxito, requiere una manipulación post-PCR que prolonga el tiempo de análisis y la manipulación de productos químicos peligrosos puede provocar contaminación en el laboratorio. Por otra parte, los procedimientos de PCR en tiempo real poseen un gran potencial para reemplazar la PCR convencional. Esto es principalmente debido a que los procedimientos por PCR en tiempo real son rápidos, sensibles, específicos, de alto grado de automatización y de cuantificación de diana (Heid y col., 1996).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

35 [0005] La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un contenido de cerdo en un alimento, donde el procedimiento incluye las etapas de extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una muestra de cerdo y diseñar un cebador directo y un cebador inverso en base al gen mitocondrial ND5 del cerdo realizando una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los cebadores directo e inverso, caracterizado porque la secuencia del cebador directo es SUS-FWD: 5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC-3') y la secuencia del cebador inverso es SUS-RVS: 5'-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3'.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

[0006]

La figura 1 muestra la prueba de especificidad en el cebador de carne de cerdo diseñada contra otras especies de carne (ternera y pollo).

45 La figura 2 muestra la prueba de sensibilidad del cebador de carne de cerdo con diluciones en serie de 10 veces.

La figura 3 muestra la optimización de la concentración del cebador.

La figura 4 muestra la optimización de la temperatura de atemperado del cebador.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

50 [0007] La invención describe el desarrollo y aplicación de un ensayo por PCR en tiempo real específico para cerdo para la autenticación Halal. Se diseñan cebadores para amplificar un amplicón de 89 pb del gen mitocondrial de ND5 (ND5) de cerdo y se desparejaron de especies comerciales de pollo y ternera. El ensayo es altamente sensible

y detectó la presencia de 0,001 ng de ADN de plantilla de cerdo cuando se valoró usando diluciones de ADN en agua. El conjunto de cebadores desarrollado para la verificación del producto Halal se basa en el gen mitocondrial ND5 de cerdo y la secuencia de los cebadores es como se indica a continuación:

Cebador directo (SUS-FWD: 5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC-3')

5 Cebador inverso (SUS-RVS: 5'-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3')

10 **[0008]** Las condiciones PCR en la detección de ADN de carne de cerdo se hacen por la amplificación en el Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Cada tubo de reacción contiene 20 µl de mezcla de reacción que consiste en 10 µl de 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania), 1 µl de cebador directo, 1 µl de cebador inverso, 3 µl de dH₂O y 5 µl de muestra de ADN (20 ng/µl). El programa de ciclo de amplificación de 3 etapas es como se indica a continuación: activación inicial a 95 °C durante 15 min, desnaturalización a 94 °C durante 15 s, atemperado a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. La etapa de activación inicial sirve para activar la Polimerasa de ADN HotStarTaq presente en la mezcla de reacción. El ciclo se repite 40 veces y se realizó un análisis de curva de fusión para verificar la especificidad y la identidad del ADN amplificado.

15 Muestras

[0009] Las tres especies que se usan en este estudio son carne de cerdo, de ternera y de pollo. Las muestras de carne se adquieren en un mercado local, el mercado al por mayor Selangor. Se almacenan a -20 °C hasta su uso para la extracción de ADN.

Extracción de ADN

20 **[0010]** Se extrae el ADN de las muestras de carne usando DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Se pesan 25 mg de muestra en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añaden 180 µl de Tampón ATL y 20 µl de K proteinasa. La mezcla se agita vorticialmente y después se incuba durante una noche a 56 °C en baño de agua para lisis. Cuando las muestras se lisan completamente, se añaden 4 µl de RNasa A (100 mg/ml), se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 2 min. La mezcla se agita vorticialmente antes de añadir 200
25 µl de Tampón AL y después se agita vorticialmente de nuevo vigorosamente. Después, se añaden 200 µl de etanol (96-100%) y se mezclan vorticialmente para producir una solución homogénea. La mezcla se pipetea en el conjunto de columna giratoria DNeasy Mini y se centrifuga a 8.000 rpm durante 1 min. El flujo saliente y el tubo de recogida se desechan. Después, la columna giratoria DNeasy Mini se coloca en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Se añaden 500 µl de Tampón AW2 y se centrifuga a 14.000 rpm durante 3 minutos para asegurar que la columna está
30 seca y no se presente arrastre de etanol. La columna giratoria DNeasy Mini se coloca entonces en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añaden 100 µl de Tampón AF para la elución. El tubo se incuba durante 1 min a temperatura ambiente y después se centrifuga durante 1 min a 8.000 rpm. El sobrenadante que contiene el ADN extraído se almacena a 4 °C antes del siguiente uso.

Diseño del cebador

35 **[0011]** Se utiliza el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) para diseñar el conjunto de cebadores usado en el análisis por PCR en tiempo real. Las secuencias del gen ND5 de la carne de cerdo (NC_000845), la ternera (NC_006853) y el pollo (NC_001323) obtenidas a partir de la base de datos del NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se alinean y se comparan. Se sintetizó un conjunto de cebadores (SUS-FWD: 5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC-3' y SUS-RVS: 5'-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3') para amplificar
40 expresamente un fragmento de 89 pb del gen ND5 de carne de cerdo.

Análisis por PCR en tiempo real

45 **[0012]** La detección de ADN de la carne de cerdo se hace por la amplificación en el Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Cada tubo de reacción contiene 20 µl de mezcla de reacción que consiste en 10 µl de 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania), 1 µl de cebador directo, 1 µl de cebador inverso, 3 µl de dH₂O y 5 µl de muestra de ADN. El programa de ciclo de amplificación de 3 etapas es como se indica a continuación: activación inicial a 95 °C durante 15 min, desnaturalización a 94 °C durante 15 s, atemperado a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. La etapa de activación inicial sirve para activar la Polimerasa de ADN HotStarTaq presente en la mezcla de reacción. El ciclo se repite 40 veces y se realizó un análisis de curva de fusión para verificar la especificidad y la identidad del ADN amplificado. A menos que se indique otra cosa, todas
50 las reacciones se realizan por triplicado.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un contenido porcino en un alimento, en el que el procedimiento incluye las etapas de:
- 5 a) extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una muestra de carne de cerdo;
- b) diseñar un cebador directo y de un cebador inverso en base al gen mitocondrial ND5 de la carne de cerdo; y
- c) realizar una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los cebadores directo e inverso;
- caracterizado por que:**
- la secuencia del cebador directo es SUS-FWD: 5'-AGC TGC ACT AGA AGC AAT CC-3')
- 10 y la secuencia del cebador inverso es SUS-RVS: 5'-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3'.
2. El procedimiento como se ha indicado en la reivindicación 1, en el que la concentración de los cebadores directo e inverso está comprendida entre 0,3 y 0,9 μm .
3. El procedimiento como se ha indicado en la reivindicación 1, en el que la temperatura de reacción está comprendida entre 50 °C y 70 °C.
- 15 4. Un procedimiento para la identificación de un contenido porcino en un alimento, en el que el procedimiento incluye las etapas de:
- a) diseñar un cebador directo y un cebador inverso en base al gen mitocondrial ND5 de la carne de cerdo; y
- b) realizar una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los cebadores directo e inverso;
- caracterizado por que:**
- 20 la secuencia del cebador directo es SUS-FWD: 5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC-3') y la secuencia del cebador inverso es de SUS-RVS: 5'-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3'.
5. Procedimiento como se ha indicado en la reivindicación 4, en el que la concentración de los cebadores directo e inverso está comprendida entre 0,3 y 0,9 μm .
- 25 6. Procedimiento como se ha indicado en la reivindicación 4, en el que la temperatura de reacción está comprendida entre 50 °C y 70 °C.

30

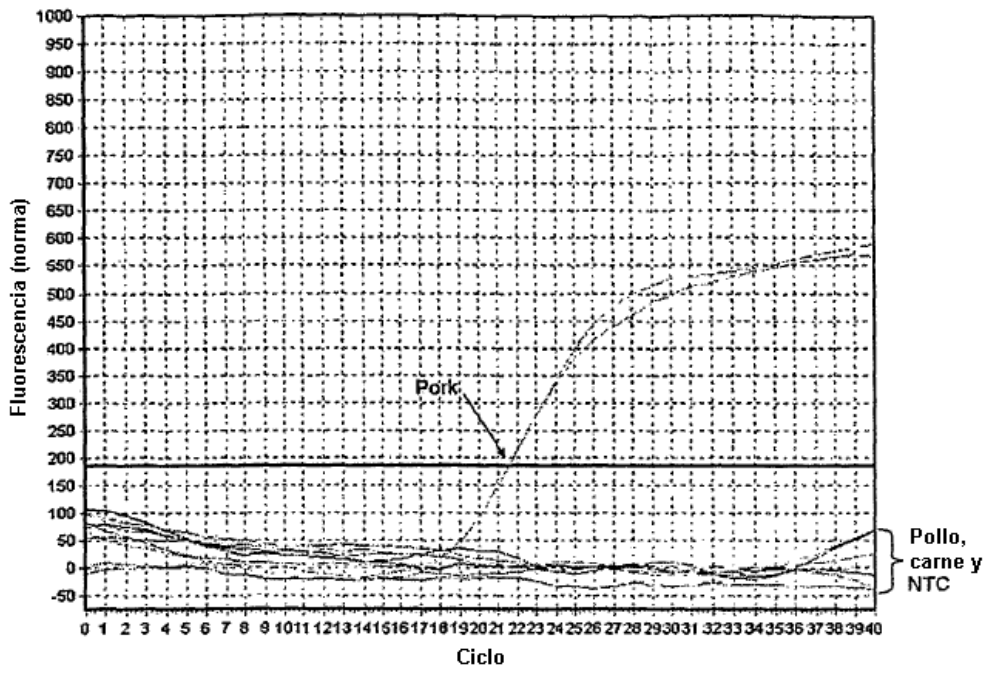


Fig. 1

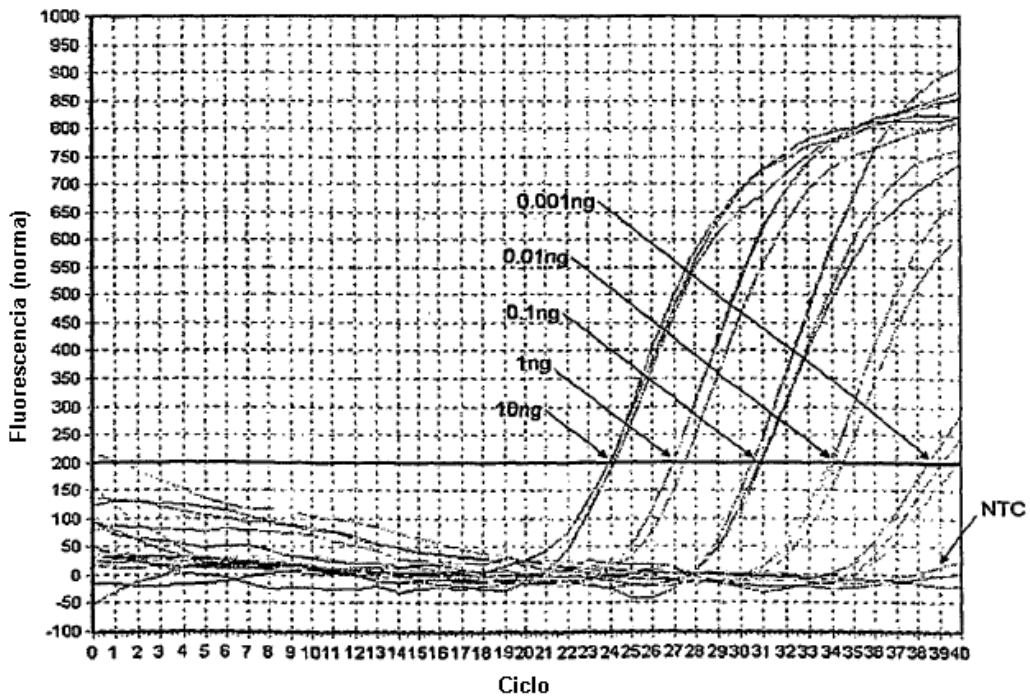


Fig. 2

Concentración Inicial (μM)	C_t Valor
0.3	20.90 ± 0.64
0.5	18.61 ± 0.29
0.7	20.92 ± 0.24
0.9	19.46 ± 0.15

Fig. 3

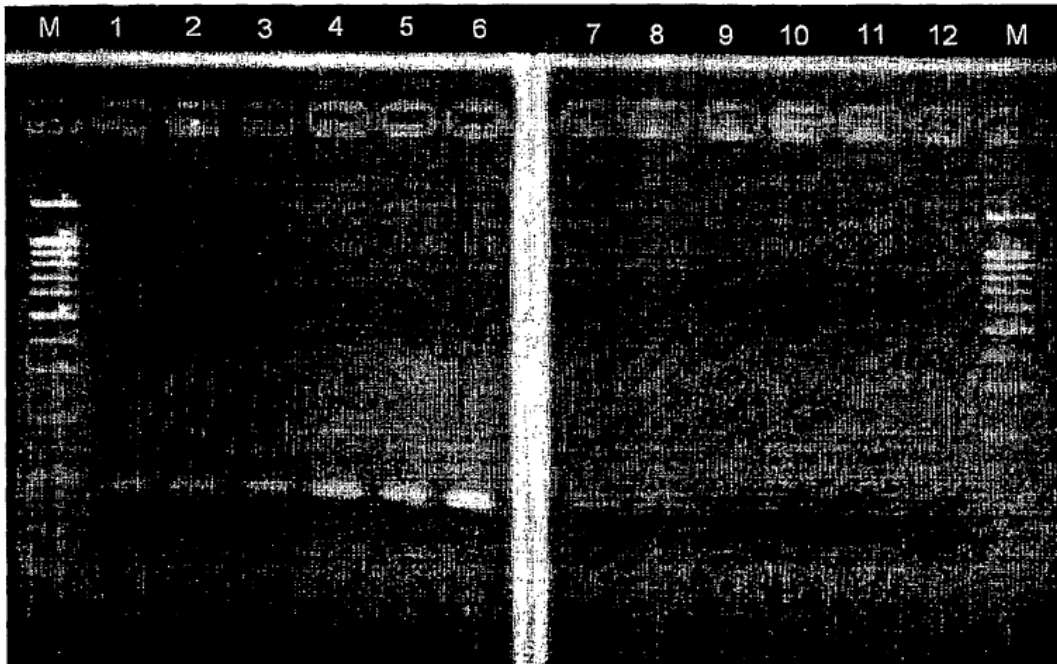


Fig. 4