

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 940**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10839323 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2518145**

54 Título: **Método para la detección cualitativa y cuantitativa de trigo común**

30 Prioridad:

21.12.2009 JP 2009289340

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

01.10.2014

73 Titular/es:

**NISSHIN SEIFUN GROUP INC. (100.0%)
25, Kanda-Nishiki-cho 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8441, JP**

72 Inventor/es:

**KITTA, KAZUMI;
FURUI, SATOSHI;
MANO, JUNICHI;
MATSUOKA, YASUYUKI;
ARAMI, SHINICHIRO;
SATO, MEGUMI;
HARAGUCHI, HIROYUKI;
KURIMOTO, YOUICHI;
IMAI, SHINJIRO y
TANAKA, KEIKO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 500 940 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

Método para la detección cualitativa y cuantitativa de trigo común

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a un método que detecta específicamente trigo común que usa un procedimiento operativo de PCR. La presente invención se refiere específicamente a un método para la detección específica cualitativa y/o cuantitativa de trigo común existente en una mezcla de interés, p.ej., una materia prima alimenticia o un alimento procesado. La presente invención se refiere, además, a un método que puede determinar si el trigo existente en una mezcla de interés es trigo común o es un trigo distinto de trigo común, por ejemplo trigo duro, y que puede detectar la presencia tanto de trigo común como de trigo no común. La presente invención se refiere, además, a un conjunto de cebadores, una sonda de ácidos nucleicos y un kit de detección para usar en los métodos de detección mencionados.

Antecedentes de la técnica

15 Los consumidores tienen gran interés en las regulaciones acerca del etiquetado de alimentos y de sistemas junto a una serie de asuntos relacionados con la seguridad de los alimentos. El etiquetado de los alimentos ha llegado a ser un asunto esencial en cuanto permite a los consumidores que evalúen y seleccionan por sí mismos la calidad de los alimentos. El trigo se convierte en una diversidad de productos mediante varios procesos y también se distribuye en el mercado. El etiquetado de macarrones, que es un producto típico, está regulado por las Normas de Etiquetado de la Calidad de Alimentos Procesados y las Normas de Etiquetado de la Calidad de los Macarrones, y las expresiones "sémola de trigo duro", "harina de trigo duro", "farina de trigo fuerte" y "harina de trigo fuerte" se exponen en orden descendente de contenido de las harinas de trigo utilizadas como materia prima. Con exclusión de estudios de rastreo de procedimientos de producción, no existe tecnología alguna que sea capaz de discriminar cualitativa y/o cuantitativamente trigo común de trigo duro en tales alimentos de trigo procesados, y existe la exigencia del desarrollo de una tecnología tal.

25 Hasta la fecha, se han formulado métodos para la detección específica y altamente sensible de trigo empleando diversas tecnologías. Estos métodos pueden clasificarse, básicamente, en métodos que utilizan como diana de detección la proteína que deriva del trigo o el DNA existente en la muestra de interés.

30 Los métodos para la detección de la proteína pueden ser puestos de ejemplo por métodos electroforéticos, métodos de transferencia western y métodos inmunquímicos, y por métodos que son combinaciones de los precedentes. En particular, los métodos ELISA han disfrutado de amplia aceptación comercial debido a la disponibilidad del equipo periférico y de reactivos.

35 No obstante, los linajes del trigo común y del trigo duro comparten una comunidad muy fuerte y sus respectivos componentes constituyentes son, por tanto, también bastante similares. La proteína no es, en este caso, una excepción y si bien existen diferencias en las proporciones de componentes proteínicos, casi no hay diferencias en los tipos de proteínas presentes en estos trigos. Por consiguiente, es bastante difícil discriminar entre trigo común y trigo duro utilizando los niveles de proteínas.

Por otra parte, se han ideado también diversas tecnologías para la detección específica de trigo empleando PCR, que es una tecnología de amplificación técnica. Sin embargo, el análisis de DNA o de genes del trigo no siempre es totalmente adecuado y esto ha hecho bastante problemático el desarrollo de un método de ensayo óptimo.

40 El Documento No Patente 1, indica un método de detección de trigo que emplea PCR y que considera objetivo el gen Wx-D1 codificado en el genoma D del trigo. Este método de ensayo es capaz de la detección con muy alta especificidad de trigo común y es óptimo para el ensayo de productos de trigo procesados tales como harinas de vegetales, de granos y harinas de trigo. El trigo duro, que carece del genoma D, no es detectado por este método de ensayo

45 El Documento de Patente 1, por otra parte, describe un método basado en PCR que detecta cualitativa y/o cuantitativamente trigo, y que tiene como objetivos el gen de la almidón sintetasa II (SSII) codificado en los genomas A, B y D del trigo. Este método de detección hace blanco en una región común de SSII A, B y D, y es capaz de la detección específica y altamente sensible de trigo. Un conjunto de cebadores que discrimina específicamente SSII-D está descrito en el Documento de Patente 1, pero la especificidad no está, necesariamente, asegurada y por tanto es inadecuado también para medidas cuantitativas.

50 El Documento No Patente 2, indica que el genoma de partida sufre un desdoblamiento físico en las etapas de tratamiento de alimentos de intensidad media o alta, tales como el calentamiento. Cuando la región diana de la amplificación de PCR existente en el genoma del trigo es grande, el acontecimiento de desdoblamiento en ese lugar ocasionado por la etapa de tratamiento puede evitar que el valor medido por PCR cuantitativa exprese el contenido real de trigo. Como resultado de ello, debe idearse una estrategia para reducir la posibilidad de que la región diana de la PCR sufra fragmentación incluso cuando el genoma de trigo haya estado sometido a fragmentación debida a la aplicación al mismo de un tratamiento de intensidad media o alta.

Por consiguiente, existe el deseo de un método capaz de la detección altamente específica y altamente sensible de trigo común existente en una materia prima alimenticia o en un producto alimenticio procesado. Además, dado que todavía no existe un método adecuado para discriminar cualitativa y/o cuantitativamente entre trigo común y un trigo no común, y detectarlos, por ejemplo, trigo duro, en una materia prima alimenticia o en un alimento procesado, existe la exigencia del desarrollo de un método tal de detección

Documento de Patente 1: Solicitud de Patente japonesa abierta a la inspección pública, No. 2009-5588.

Documento No Patente 1: Iida, M. et al., Development of taxon-specific sequences of common wheat for the detection of genetically modified wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 53(16):6294-300, 10 Agosto (2005).

Documento No Patente 2: Yoshimura, T. et al., Comparative studies of the quantification of genetically modified organisms in foods processed from maize and soy using real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6):2060-9, marzo 23 (2005).

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método específico y altamente sensible para detectar cualitativa y/o cuantitativamente trigo común en el trigo presente en una muestra de interés, p.ej., una materia prima alimenticia o un alimento procesado. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método que puede discriminar y detectar cualitativa y/o cuantitativamente entre trigo común y trigo no común, p.ej., trigo duro, existente en una materia prima alimenticia o un alimento procesado.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un conjunto de cebadores, una sonda de ácidos nucleicos y un kit de detección que puede emplearse en los métodos de detección mencionados que utilizan un procedimiento operativo de PCR.

Como resultado de investigaciones intensas y extensas con objeto de conseguir estos objetos, los inventores presentes han descubierto una secuencia de ácidos nucleicos específica en la almidón sintetasa II-D ubicada en el genoma D del trigo (abreviatura: SSII-D) y han descubierto también que podía conseguirse la detección específica y de alta sensibilidad, de trigo común en el trigo de una muestra de interés, diseñando un conjunto de cebadores basado en esta secuencia de ácidos nucleicos y llevando a cabo un procedimiento operativo de PCR utilizando este conjunto de cebadores. Además, con objeto de descubrir una sonda de ácidos nucleicos eficaz para poner en práctica un procedimiento operativo de PCR cuantitativa, los presentes inventores han diseñado una sonda de ácidos nucleicos especial que procede del interior de la secuencia de ácidos nucleicos de la región acotada por esta sonda situada sobre el gen SSII-D.

Los presentes inventores descubrieron también que era posible discriminar entre trigo común y trigo no común, p.ej. trigo duro, existente en una muestra de interés, combinando el método de detección de trigo común mencionado, con un método para detectar una amplia gama de trigos mediante la detección específica y altamente sensible de una región común de la SSII ubicada en los genomas A, B y D del trigo, y llevando a cabo una comparación relativa y/o una comparación absoluta de los resultados obtenidos mediante estos métodos.

El genoma del trigo se compone de tres genomas designados A, B y D, y cada uno de ellos posee siete cromosomas. El trigo común es un hexaploide AABBDD y el trigo duro es un tetraploide AABB. Hasta la fecha, se sabe que un gran número de genes del trigo son idénticos y también se ha acumulado información acerca de la conformación de estos genes, pero esta información no siempre es totalmente adecuada.

Entre lo precedente, la presente invención se ha enfocado en particular sobre la almidón sintetasa II (abreviada como SSII-A, SSII-B y SSII-D) cuya conformación ha sido determinada en cada uno de los genomas A, B y D. Se ha indicado que estas SSII están codificadas sobre el brazo corto del cromosoma 7 existente en cada uno de los genomas A, B y D del trigo (Shimbata, T. et al., Mutations in wheat starch synthase II genes and PCR-based selection of a SGP-1 null line *Theor. Appl. Genet.*, 111(6): 1072-9, Oct. (2005).

Existen diferencias sutiles entre las secuencias de bases de la SSII codificadas en los genomas individuales A, B y D, y asimismo es posible discriminar específicamente cada uno de SSII-A, B y D. mediante el proceso de diseño del conjunto de cebadores. Sintetizando esta información, se llegó a la conclusión de que podría ser posible detectar específicamente el grupo de trigo común, que tiene el genoma D, descubriendo una secuencia de bases característica que pusiera de manifiesto diferencias sutiles entre SSII-A, SSII-B y SSII-D.

Así pues, se consiguió la detección de trigo común existente en una muestra de interés, seleccionando una secuencia de bases característica de SSII-D, ubicada en el genoma D presente en el trigo común pero que no tiene reacción cruzada con otras plantas ni con el trigo duro, que carece del genoma D, diseñando una sonda de ácidos nucleicos y un conjunto de cebadores que complementariamente se hibridan a esta secuencia de ácidos nucleicos, y poniendo en práctica un procedimiento operativo de PCR utilizando lo precedente. Además, se consiguió la capacidad de discriminar cualitativa y/o cuantitativamente entre trigo común y trigo no común, p.ej., trigo duro, en el trigo existente en una muestra de interés, llevando a cabo el procedimiento operativo de PCR antes indicado; poniendo en práctica un método desarrollado previamente, es decir, un procedimiento operativo de PCR dirigido hacia la región común

de SSII-A, B y D, en la misma muestra; y realizando una comparación relativa y/o una comparación absoluta de la expresión del producto de amplificación de PCR por medio de estos dos procedimientos operativos de PCR,

Por consiguiente, la presente invención es un método para detectar la presencia de trigo común en una muestra de interés, en donde el método incluye poner en práctica un procedimiento operativo de PCR que usa un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO:6, con un ácido nucleico extraído de la muestra de interés, que se utiliza como molde; y detectar la presencia de un producto de amplificación de PCR. En este método, puede confirmarse la presencia de un producto de amplificación de PCR por métodos conocidos, por ejemplo, mediante una técnica de electroforesis, y confirmarse después la presencia de trigo común al observar el producto de amplificación de PCR.

10 La presente invención se dirige también a un método para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de trigo común llevando a cabo un procedimiento operativo de PCR cuantitativa utilizando el conjunto de cebadores antes descrito y una sonda de ácidos nucleicos específica. La presente invención, por tanto, es un método para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de trigo común en una muestra de interés, poniendo en práctica un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que usa un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, y una sonda de ácidos nucleicos que tiene la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11, con un ácido nucleico extraído de la muestra de interés, que se emplea como molde.

20 En una realización de este método según la presente invención, la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 11, es específicamente una sonda de ácidos nucleicos marcada y la presencia de trigo común puede detectarse cualitativa y/o cuantitativamente obteniendo una curva de amplificación durante la realización de la PCR, monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación y generada por la sonda de ácidos nucleicos marcada.

25 En una realización del método descrito en esta memoria, se lleva a cabo preliminarmente un procedimiento operativo de PCR cuantitativa sobre muestras tipo diluidas en serie, obteniendo curvas de amplificación; se determina un ciclo umbral (valor Ct) estableciendo un umbral adecuado; después se construye una curva de calibración en función de la cantidad inicial de molde; y se determina la cantidad inicial de molde existente en una muestra de interés utilizando la curva de calibración. Por consiguiente, una realización adicional es la detección cuantitativa, cuando se lleva a cabo el procedimiento operativo de PCR cuantitativa antes citado, de la presencia de trigo común utilizando una curva de calibración construida con anterioridad.,

30 La presente invención se dirige también a un conjunto de cebadores que comprende un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO: 6, a una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO: 11, y a una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases indicada en SEQ ID NO: 11, tiene un extremo 5' terminal modificado por un fluoróforo, y posee un extremo 3' terminal modificado por un desactivador de fluorescencia (quencher).

La presente invención es también un método para detectar la presencia de trigo común y/o un trigo diferente de trigo común, existente en una muestra de interés. que comprende

(1) Preparar una muestra de ácidos nucleicos extrayendo un ácido nucleico procedente de la muestra de interés;

y

40 (a) detectar la presencia de trigo común poniendo en práctica un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que utiliza esta muestra de ácidos nucleicos, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 5, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 11, y obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación que ha sido generado por la sonda de ácidos nucleicos, y

45 (b) detectar la presencia de trigo poniendo en práctica un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que utiliza la muestra de ácidos nucleicos mencionada, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 9, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:10, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 13, y obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación que ha sido generado por la sonda de ácidos nucleicos, y

(2) comparar los resultados de (a) con los resultados de (b).

55 En una realización del método mencionado, se lleva a cabo preliminarmente una PCR cuantitativa sobre muestras tipo diluidas en serie para obtener curvas de amplificación, se determina un valor Ct estableciendo un umbral adecuado; después, por anticipado, se construye una curva de calibración en función de la cantidad inicial de molde; y se determina la cantidad inicial de molde existente en una muestra de interés usando esta curva de calibración.

Por consiguiente, en una realización del método mencionado, (1) en (a), se obtiene una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación que ha sido generado por la sonda de ácidos nucleicos y la presencia de trigo común se detecta cuantitativamente utilizando una curva de calibración que ha sido construida por anticipado, y en (b) se obtiene una curva de amplificación monitorizando una
 5 señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación que ha sido generado por la sonda de ácidos nucleicos y se detecta cuantitativamente la presencia de trigo usando una curva de calibración que ha sido construida por adelantado; y (2) se compara el valor cuantitativo de (a) con el valor cuantitativo de (b).

En este método, por ejemplo, cuando se detecta la presencia de trigo común en (a) y se compara este valor cuantitativo con el valor cuantitativo de trigo procedente de (b) y el valor cuantitativo de (a) < el valor cuantitativo de
 10 (b), puede deducirse entonces que esta diferencia es debida a trigo no común existente en la muestra de interés. Además, cuando no se detecta en (a) un producto de amplificación de PCR mientras que se detecta en (b) un producto de amplificación de PCR, esto confirma que no está presente en la muestra de interés trigo común, al tiempo que está presente un trigo no común, p.ej., trigo duro.

Con respecto a la ejecución específica del método mencionado para detectar la presencia de trigo común y/o trigo no común, ambas sondas, la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 11 y la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 13, pueden ser sondas de ácidos nucleicos marcadas. Más específicamente la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 11 puede ser una sonda de ácidos nucleicos modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo y modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia.,
 15 y la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO: 13 puede ser una sonda de ácidos nucleicos modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo y modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia

La presente invención se dirige también a los siguientes kits para realizar los métodos de detección mencionados: (i) un kit de detección de trigo común que comprende un conjunto de cebadores con un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6; (ii) un kit de detección de trigo común que comprende un conjunto de cebadores con un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 6 y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO: 11, que está modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo, y que está modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia; y /iii) un kit de detección de trigo común que comprende un conjunto de cebadores con un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11, que está modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo, y que está modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia, un conjunto de
 20 cebadores con un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:9 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:10, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:13 que está modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo y que está modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia.

La presencia de trigo común en una muestra de interés puede detectarse cualitativa y/o cuantitativamente con alta especificidad y alta sensibilidad, por el método de detección de trigo común de la presente invención. Además, puede llevarse a cabo con el método de la presente invención una discriminación muy exacta de si el trigo de una muestra de interés es trigo común, o es un trigo no común, tal como trigo duro, o ambos. El método de la presente invención puede detectar también cuantitativamente el trigo común y/o trigo no común, p.ej., trigo duro existente en una muestra de interés.

El método de la presente invención es útil como un método para identificar el trigo presente en una muestra de interés, p.ej., en un alimento procesado, y es útil como método para discriminar entre si este trigo es trigo común, o es un trigo no común (trigo duro es un ejemplo típico), o ambos, y es útil como método de detección de los mismos.

El método de la presente invención puede ser conveniente, rápida y muy exactamente puesto en práctica utilizando el conjunto de cebadores de la presente invención, la sonda de ácidos nucleicos de la presente invención, y el kit de la presente invención que comprende lo precedente.

Descripción breve de los dibujos

La FIG. 1 es una fotografía que muestra el límite de detección de trigo común por PCR

La FIG. 2 muestra una evaluación (correlación entre el número de ciclos de PCR para alcanzar la línea umbral y el logaritmo del DNA de molde) del conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L.;SEQ ID NOS:5/6) y la sonda de ácidos nucleicos SSII-D1797T (SEQ ID NO:11) para la detección de trigo común en la PCR cuantitativa.

La FIG. 3 expone una evaluación (especificidad para trigo común del conjunto de cebadores y la sonda de ácidos nucleicos) del conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L.;SEQ ID NOS:5/6) y la sonda de ácidos nucleicos SSII-D1797T (SEQ ID NO:11) para la detección de trigo común en la PCR cuantitativa.

La FIG.4 expone los resultados de la PCR cuantitativa sobre soluciones mixtas de DNA genómico de trigo común y DNA genómico de trigo duro en diferentes razones de mezcla, utilizando el conjunto de cebadores 5 (SSII-A3118U/3231L:SEQ ID NOS: 9/10) y la sonda de ácidos nucleicos SSII-Aex7-T82 (SEQ ID NO:13) para la detección de trigo.

5 La FIG. 5 muestra los resultados de la PCR cuantitativa llevada a cabo utilizando el conjunto de cebadores 5 (SSII-A3118U/3231L: SEQ ID NOS:9/10) y la sonda de ácidos nucleicos SSII-Aex7-T82 (SEQ ID NO:13) para la detección de trigo y que usa DNAs de molde preparados extrayendo el DNA genómico de harina de trigo común y de harina de trigo duro mezcladas en proporciones diferentes.

10 La FIG. 6 expone los resultados de la PCR cuantitativa sobre soluciones mixtas de DNA genómico de trigo común y DNA genómico de trigo duro en diferentes razones de mezcla, apropiadas, que utiliza el conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L: SEQ ID NOS:5/6) y la sonda de ácidos nucleicos SSII-D1797T (SEQ ID NO:11) para la detección de trigo común.

15 La FIG. 7 expone los resultados de la PCR cuantitativa llevada a cabo utilizando el conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L: SEQ ID NOS:5/6) y la sonda de ácidos nucleicos SSII-D1797T (SEQ ID NO:11) para detectar trigo común y que utiliza DNAs de molde preparados extrayendo el DNA genómico de harina de trigo común y harina de trigo duro mezcladas en proporciones diferentes, apropiadas.

La FIG. 8 muestra la conexión obtenida de los resultados de la FIG. 6, entre la proporción de mezcla de trigo común y el número de ciclos de PCR para alcanzar la línea umbral; y

20 La FIG 9 muestra la conexión obtenida de los resultados de la FIG 7, entre la proporción de mezcla de trigo común y el número de ciclos de PCR para alcanzar la línea umbral.

Modo mejor para llevar a cabo la invención

25 En la presente invención, trigo se refiere a todo trigo cultivado como trigo comestible, con inclusión de trigos comunes, que poseen una estructura genómica hexaploide AABBDD, y trigos de dos granos (principalmente trigo duro), que son tetraploides AABB. Los trigos comunes pueden clasificarse, por ejemplo, en los trigos comunes en general y de uso amplio, así como también el trigo compacto (*T. compactum*) y el trigo espelta (*T. spelta*). Además del trigo duro, también está clasificado como trigo de dos granos, por ejemplo, el trigo forrajero (*T. dicoccum*).

La presente invención es útil para discriminar entre trigo común y trigo de dos granos, p.ej., trigo duro, en muestras diversas de interés, p.ej., materias primas alimenticias y alimentos procesados.

30 Sigue una descripción detallada de la muestra de interés empleada por la presente invención, la extracción de ácido nucleico (por ejemplo DNA) de la muestra de interés, la preparación de la muestra de ácidos nucleicos, la secuencia de bases diana de la detección, el conjunto de cebadores, la sonda de ácidos nucleicos, las condiciones de la PCR y el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa.

35 La muestra de interés es una muestra de interés que permite la extracción de un ácido nucleico, p.e., DNA genómico o uno de sus fragmentos, que se origina de la muestra de interés, pero que, por otra parte, no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede utilizarse como la muestra de interés una planta, una materia prima, un material presente en una etapa de tratamiento, o un alimento procesado.

40 Ejemplos de ellos son semillas recientes, semillas secas, polvos tales como harina de trigo débil, productos semi-procesados tales como sémolas, y alimentos que han sido cocinados con calor, tales como pastas y tallarines. Si es necesario, estas muestras de interés pueden emplearse procesadas en una forma adaptada para la extracción del ácido nucleico, por ejemplo, por pulverización.

No hay límites específicos para el contenido de trigo de la muestra de interés; sin embargo, la presencia/ausencia de trigo en la muestra de interés puede discriminarse y medirse cuantitativamente la presencia de trigo en la presente invención cuando la solución de muestra de ácido nucleico preparada extrayendo ácido nucleico de la muestra de interés contiene al menos 10 ppm y, preferiblemente, no menos que 50 ppm de ácido nucleico derivado de trigo.

45 Además, en comparación con productos biológicos tales como proteínas, el ácido nucleico es relativamente estable a tratamiento físico, tal como el empleo de calor o presión, y es posible una buena detección incluso cuando el ácido nucleico está presente en microcantidades en un producto procesado que ha sido sometido a un tratamiento tal.

La exposición precedente significa que será posible obtener datos básicos para detectar una mezcla de trigos no pretendida por el fabricante, existente en diversos productos alimenticios.

50 El ácido nucleico que procede de la muestra de interés es, preferiblemente, DNA genómico de una planta presente en la muestra de interés. No hay limitaciones particulares sobre el método de extracción de ácido nucleico de la muestra interés y puede utilizarse cualquier método o cualquier kit en tanto en cuanto el método asegure una calidad suficiente para someter al procedimiento operativo de PCR. Por ejemplo, puede utilizarse el método CTAB o puede utilizarse un kit comercial, p.ej., un QIAGEN Plant mini Kit (de Quiagen GmbH).

.Estos métodos pueden modificarse también según sea necesario. El ácido nucleico extraído por estos métodos es preservado, deseablemente, en un estado apropiado para usar como molde en el procedimiento operativo de PCR; por ejemplo, se disuelve preferiblemente en un tampón adecuado y se guarda a temperaturas bajas. Procediendo de este modo, puede prepararse una solución de ácido nucleico que será la muestra de ácido nucleico, por ejemplo,
5 una solución de DNA molde.

La concentración y pureza del ácido nucleico obtenido pueden analizarse midiendo la absorbancia en 230, 260, 280 y 320 nm, empleando un espectrofotómetro. La solución de ácido nucleico utilizada para llevar a cabo el procedimiento operativo de PCR, se ensaya preferiblemente como que tiene una razón de absorbancias de 260/230 nm de al menos 2,0 y una razón de absorbancias de 260/280 nm en torno a 1,8

10 En este caso, existe el riesgo de mezcla de RNA dado que la razón de 269/280 nm se aproxima a 2,0 y debido a este hecho debe tenerse precaución al analizar la concentración de DNA.

Con objeto de evaluar el DNA extraído, el desarrollo de la PCR puede ser comprobado utilizando electroforesis en gel de agarosa y un conjunto de cebadores complementario de un gen, específico de la especie, del vegetal que constituye la muestra de interés.

15 Un gran número de genes han sido identificados a medida que los métodos de determinación de las secuencias de bases de DNA han sido mejorados, y hasta la fecha han sido publicadas ampliamente bases de datos muy grandes de secuencias de bases, por organizaciones tales como el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de la salud, y el Banco de Datos de DNA de Japón (DDBJ) del Instituto Nacional de Genética. Estas bases de datos o una secuencia de bases adquirida y analizada durante experimentos de laboratorio, pueden
20 emplearse para la secuencia de bases de DNA del trigo que será el objetivo de la detección. Por regla general, el DNA de vegetales, con inclusión del trigo, está compuesto de DNA genómico, DNA de cloroplastos, y DNA mitocondrial. El DNA genómico se encuentra en la células como solamente un conjunto único en el núcleo, mientras que, por el contrario, el DNA de los cloroplastos y el DNA mitocondrial tienen varios entre células y tejidos debido a que dependen del número de orgánulos particulares presentes en una célula.

25 A fin de conseguir los objetos de la presente invención, fue necesario seleccionar, como la diana de detección, una secuencia de bases de DNA que fuera específica del DNA existente en el genoma D del trigo y para el cual se había determinado el número de copias existente en el DNA del genoma D del trigo. Utilizando la secuencia de bases seleccionada como datos básicos, puede diseñarse un conjunto de cebadores y una sonda de ácidos nucleicos, bien adecuados para un método de detección que se basa en la PCR.

30 Varias condiciones están impuestas en el diseño de conjuntos de cebadores. Así pues, aun cuando puede utilizarse cualquier conjunto de cebadores que puede amplificar específicamente la secuencia de bases de DNA que es el objetivo de la amplificación, dado que el DNA genómico existente en la muestra de interés sufre fragmentación durante las etapas de tratamiento cuando la muestra de interés es un alimento procesado, el conjunto de cebadores se diseña, deseablemente, para proporcionar un producto de amplificación de PCR de 80 a 500 bp y más
35 preferiblemente, de 80 a 150 bp. aproximadamente. Con objeto de obtener un producto de amplificación de PCR adecuado, la secuencia de bases de la sonda de ácidos nucleicos utilizada para la PCR cuantitativa y el conjunto de cebadores deben satisfacer varias obligaciones. La sonda de ácidos nucleicos utilizada en la PCR cuantitativa se diseña, deseablemente, para que tenga, aproximadamente una Tm 10°C mayor que el valor de la Tm del correspondiente conjunto de cebadores y una longitud de aproximadamente 18 a 25 bases con objeto de que
40 retenga el efecto de desactivación fluorescente.

Los presentes inventores, teniendo en cuenta los enfoques indicados, han descubierto una secuencia de bases específica.

En este caso, la secuencia de bases de SEQ ID NO:5 es la secuencia en las posiciones 1769 a 1791 del gen SSII.D del trigo; la secuencia de bases de SEQ ID NO:6 es una secuencia complementaria a las posiciones 1889 a 1865
45 del gen SSII-D del trigo; y éstas forman un conjunto de cebadores. Además, la secuencia de bases de SEQ ID NO:11 es la secuencia en las posiciones 1797 a 1819 del gen SSII-D del trigo.

Aún más, la secuencia de bases de SEQ ID NO:9 es la secuencia en las posiciones 3118 a 3136 del gen SSII-A del trigo; la secuencia de bases de SEQ ID NO:10 es una secuencia complementaria a las posiciones 3231 a 3211 del gen SSII-A del trigo y éstas forman un conjunto de cebadores. La secuencia de bases de SEQ ID NO:13 es la
50 secuencia en las posiciones 3161 a 3185 del gen SSII-A del trigo.

La PCR puede llevarse a cabo usando el conjunto de cebadores diseñado procediendo como antes y empleando como molde ácido nucleico extraído de la muestra de interés, o la PCR cuantitativa puede llevarse a cabo usando el conjunto de cebadores diseñado procediendo como antes, ácido nucleico extraído de la muestra de interés, como molde, y también una sonda de ácidos nucleicos

55 La ejecución del procedimiento operativo de PCR y el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa puede utilizar el equipo habitual de que se dispone en el comercio y puede emplear varios métodos conocidos y modificaciones

de los mismos. No existen limitaciones particulares sobre el procedimiento operativo específico utilizado durante la ejecución del procedimiento operativo de la PCR o del procedimiento operativo de la PCR cuantitativa.

La presente invención se dirige a un método para detectar la presencia de trigo común existente en una muestra de interés, en donde el método comprende llevar a cabo un procedimiento operativo de PCR utilizando como molde, un ácido nucleico extraído de la muestra de interés, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5, y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, y detectar la presencia de un producto de amplificación de PCR.

Para llevar a cabo el procedimiento operativo de PCR, puede prepararse una solución de reacción PCR mezclando cantidades apropiadas de, por ejemplo, cada uno de los reactivos siguientes: el conjunto de cebadores, el ácido nucleico que sirve de molde, un tampón adecuado tal como Tris-HCl, dNTP, cloruro potásico, cloruro magnésico y una DNA sintetasa resistente al calor.

La reacción PCR se compone de las tres etapas siguientes: desnaturalización térmica del DNA de molde, hibridación de extremos complementarios (reasociación) del DNA de molde con el conjunto de cebadores, y una reacción de síntesis de DNA llevada a cabo por la DNA sintetasa resistente al calor. Debido a que cada una de estas etapas requiere diferentes temperatura y distintos tiempos, estas condiciones se establecen en intervalos adecuados tomando en consideración la secuencia de bases de la región que ha de ser amplificada y su longitud. Las condiciones específicas de las etapas de la reacción PCR no están limitadas particularmente, y la reacción PCR puede llevarse a cabo, por ejemplo, manteniendo durante 10 minutos a 95°C, repitiendo luego 35 a 40 ciclos donde 1 ciclo consiste en 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, y 1 minuto a 72°C, manteniendo durante 7 minutos a 72°C una vez completado el ciclo, y manteniendo después a 4°C.

Esta reacción puede llevarse a cabo empleando el equipo instrumental habitual de que se dispone en el comercio, que incluye también equipo para llevar a cabo la PCR cuantitativa.

No hay limitaciones particulares en la presente invención en cuanto a la detección del producto de amplificación de PCR, pero la detección del producto de amplificación de PCR se lleva a cabo, típicamente, mediante un método electroforético o un método de detección de fluorescencia. Por ejemplo, el producto de amplificación de PCR que procede de la muestra de interés puede someterse a electroforesis en gel de agarosa, si es necesario en combinación con un testigo negativo, un testigo positivo y un marcador, y la electroforesis se sigue luego por tinción con un intercalador tal como bromuro de etidio, y detección por exposición a luz ultravioleta.

En este caso, la observación de una banda del producto de amplificación de PCR significa, entonces, que se encuentra presente trigo común en la muestra de interés.

La presente invención se dirige también a un método para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de trigo común en una muestra de interés, en donde se pone en práctica un procedimiento operativo de PCR cuantitativa empleando como molde un ácido nucleico extraído de la muestra de interés y usando un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11.

Este procedimiento operativo de la PCR cuantitativa denota, generalmente, la ejecución de una serie de reacciones con objeto de cuantificar la cantidad de un ácido nucleico empleado como molde, por ejemplo, la cantidad de un DNA de molde, en la solución de reacción al comienzo de la reacción de amplificación de PCR. Puede utilizarse específicamente un procedimiento operativo de PCR en tiempo real como el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa. Puede emplearse un intercalador en el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa o una sonda marcada fluorescente. Cuando se emplea una sonda marcada fluorescente, esta sonda induce variaciones de las señales en correspondencia con el número de moléculas de producto de amplificación producidas mediante la reacción de amplificación de PCR.

Se prefiere para la presente invención, el empleo de una sonda marcada fluorescente, y es más preferido el uso del método de la sonda TaqMan. La sonda de ácidos nucleicos que consiste en SEQ ID NO:11 y la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO:13, pueden incorporarse en sondas TaqMan que pueden causar las variaciones de las señales a que se ha aludido antes. Para esta sonda de ácidos nucleicos se utiliza habitualmente DNA.

Se usa la sonda de ácidos nucleicos descrita precedentemente, doblemente marcada con un fluoróforo y un desactivador de fluorescencia (quencher) (una sustancia que posee actividad de desactivación fluorescente)), para llevar a cabo el método de la sonda TaqMan. En general el extremo 5' terminal de la sonda de ácidos nucleicos se modifica con un fluoróforo y el extremo 3' terminal se modifica con un desactivador de fluorescencia. El fluoróforo puede ser puesto de ejemplo por FAM, HEX, TET y FITC, mientras que el desactivador de fluorescencia puede ser puesto de ejemplo por TAMRA, Eclipse y DABCYL. No existen limitaciones particulares en cuanto al fluoróforo y el desactivador de fluorescencia, y puede hacerse uso de una selección adecuada de fluoróforos y desactivadores de fluorescencia que se ajusta a la ejecución del método de la sonda TaqMan.

Dependiendo de la reacción de amplificación de PCR, la sonda TaqMan mencionada se somete a digestión por DNA polimerasa y la fluorescencia de la solución de reacción de la PCR queda aumentada por la liberación del fluoróforo. Se obtiene una curva de amplificación monitorizando la intensidad de la señal detectada debida a la fluorescencia que resulta. Un aumento de fluorescencia es, entonces, un indicador que expresa el grado de aumento del producto de amplificación de PCR. Esto hace posible una detección sencilla y conveniente, en tiempo real, del estado de la amplificación durante la PCR.

Para realizar el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa, el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa se lleva a cabo previamente sobre muestras tipo diluidas en serie para obtener curvas de amplificación; se determina un ciclo umbral (valor Ct) estableciendo un umbral adecuado; luego, por anticipado, se construye una curva de calibración en función de la cantidad inicial de molde; y se determina la cantidad inicial de molde de la muestra de interés utilizando esta curva de calibración. Así pues, se determina el valor Ct para la muestra de interés del mismo modo que para las muestras tipo y entonces puede determinarse la cantidad inicial de molde haciendo uso de la curva de calibración

Para llevar a cabo el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa, puede prepararse una solución de reacción PCR mezclando cantidades apropiadas de, por ejemplo, cada uno de los reactivos siguientes: el conjunto de cebadores, la sonda de ácidos nucleicos, el ácido nucleico que sirve de molde, un tampón adecuado, dNTP, cloruro potásico, cloruro magnésico y una DNA sintetasa resistente al calor. Las condiciones de reacción para realizar el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa, pueden establecerse del mismo modo descrito anteriormente para el procedimiento operativo de PCR. Además, puede utilizarse el equipo instrumental conocido para la puesta en práctica del procedimiento operativo de la PCR cuantitativa.

La presente invención se dirige, además, a un método de detección que combina el método descrito anteriormente para detectar la presencia de trigo común existente en una muestra de interés que usa un procedimiento operativo de PCR cuantitativa, con un método de detección de una amplia variedad de trigos, que usa un procedimiento operativo de PCR cuantitativa.

Este es un método para detectar la presencia de trigo común y/o de un trigo no común en una muestra de interés, y comprende específicamente:

(1) preparar una muestra de ácido nucleico extrayendo un ácido nucleico de la muestra de interés, y

(a) detectar cuantitativamente la presencia de trigo común por puesta en práctica de un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que utiliza esta muestra de ácido nucleico, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, y una sonda de ácidos nucleicos marcada que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11, obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación que ha sido generado por esta sonda de ácidos nucleicos marcada, y detectar cuantitativamente la presencia de trigo común usando una curva de calibración que ha sido construida por anticipado, y

(b) detectar cuantitativamente la presencia de trigo por puesta en práctica de un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que utiliza la muestra de ácido nucleico mencionada, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:9, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:10, y una sonda de ácidos nucleicos marcada que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:13, obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación que ha sido generado por la sonda de ácido nucleico marcada y usar una curva de calibración que ha sido construida por anticipado, y

(2) comparar los resultados de (a) con los resultados de (b).

Por ejemplo, la muestra de ácido nucleico preparada extrayendo ácido nucleico de la muestra de interés, puede dividirse en dos; por ejemplo, puede dividirse en al menos dos volúmenes iguales, y estos pueden someterse, respectivamente, a las reacciones de la PCR cuantitativa indicadas en (a) y (b) anteriores.

Por ejemplo, se confirma la presencia de trigo común en el método precedente cuando se detecta la presencia de trigo común en (a) y el valor cuantitativo no difiere del valor cuantitativo para el trigo en (b). Además, por ejemplo, cuando se detecta la presencia de trigo común en (a) y, comparando su valor cuantitativo con el valor cuantitativo del trigo en (b) se encuentra que el valor cuantitativo en (a) < valor cuantitativo en (b), puede suponerse que esta diferencia está originada por trigo no común existente en la muestra de interés y puede asumirse la presencia en la muestra de interés de ambos, trigo no común y trigo común. Además, cuando, por ejemplo, no se detecta un producto de amplificación de PCR en (a) mientras que se detecta un producto de amplificación de PCR en (b), esto confirma que no está presente trigo común en la muestra de interés y que se encuentra presente en la muestra de interés un trigo no común, por ejemplo, trigo duro.

Utilizando este método, puede detectarse cuantitativamente la presencia de trigo común y trigo no común en la muestra de interés, mediante un cálculo matemático que usa las curvas de calibración que han sido construidas al mismo tiempo

El kit de la presente invención puede ser utilizado como un kit de reactivos para poner en práctica el procedimiento operativo de PCR o el procedimiento operativo de la PCR cuantitativa en los métodos de la presente invención. El kit de la presente invención puede incluir también varios reactivos optimizados para la puesta en práctica de la PCR y reactivos para la detección

- 5 El kit de la presente invención, debido a que puede detectar indicios de trigo y/o trigo común hace posible adquirir no solamente datos sobre si hay trigo presente en una muestra de interés, sino que también hace posible determinar la presencia/ausencia de trigo común y la presencia/ausencia de trigo duro, y sus cantidades respectivas.. Como consecuencia de ello, puede exponerse una clasificación de las harinas de trigo de partida empleadas en un producto que hace uso de trigo duro, p.ej., macarrones.

10 Ejemplos

La presente invención se describe más específicamente en los ejemplos que siguen, pero la presente invención no se limita a esos ejemplos.

1. Método de construcción de un conjunto de cebadores para detectar trigo común y una sonda de ácidos nucleicos para cuantificación.

15 < Selección de genes diana >

El DNA genómico del trigo está compuesto, en general, por tres tipos de genomas, designados respectivamente A, B y D. El trigo común es un hexaploide que posee el genoma AABBDD, mientras que el trigo duro es un tetraploide que tiene el genoma AABB. La almidón sintetasa II, que es el gen diana de la presente invención, está ubicado sobre el brazo corto de cada cromosoma 7 en los genomas A, B y D del trigo; estos genes son abreviados, respectivamente, como SSII-A, SSII-B y SSII-D (Shimbata, T et al., Mutations in wheat starch synthase II genes and PCR-based selection of a SGP-1 null line. *Theor. Appl. Genet.*, 111(6): 1072-9, Oct. 2005.

- 20 Se llegó a la conclusión de que los objetos de las presentes tareas podían conseguirse si pudiera formularse un método de detección de trigo común basado en PCR, usando estos genes como los genes diana, y usando un conjunto de cebadores que se hibridara específicamente con una secuencia de bases sobre el genoma D, y se seleccionó como el gen diana de detección el SSII-D (gen de *Triticum aestivum* SSII-D de la almidón sintetasa II-D, cds. completo. No. de catálogo AB201447, longitud total de 7010 bp) (SEQ ID NO:12).

< Diseño de un conjunto de cebadores específico para SSII-D >

Usando como diana el gen SSII-D, se llevó a cabo una investigación usando el soporte lógico de ingeniería genética Primer Express ver. 2.0.0 (de Applied Biosystems Inc.) para secuencias de bases que pudieran ser candidatos de cebadores. Deben ser satisfechas una diversidad de condiciones, p.ej., contenido por CG, valor Tm, longitud de las secuencias de bases y longitud del producto de PCR, con objeto de diseñar un cebador óptimo. Se seleccionó, como resultado, una pluralidad de secuencias de bases de candidatos de cebadores. Las secuencias de bases seleccionadas fueron reducidas, mediante una búsqueda BLAST, a cebadores que tuvieran un alto potencial para reconocer, específicamente, SSII de trigo, y finalmente fueron seleccionados cuatro conjuntos de cebadores. Los valores Tm de estos cuatro conjuntos de cebadores fueron calculadas teóricamente partiendo de la secuencia de bases y se utilizaron como índice para establecer la temperatura de reasociación óptima en las reacciones PCR. Estos cuatro conjuntos de cebadores son el SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, el SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, el SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, y el SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, indicados en la Tabla 2 que figura más adelante.

- 35 < Diseño de una sonda de ácidos nucleicos específica de SSII-D para PCR cuantitativa >

40 Si bien varios procedimientos operativos de PCR cuantitativa han sido indicados ya, se usó el procedimiento operativo de la sonda TaQMan, que es un tipo de procedimiento operativo de PCR cuantitativa, debido a la extensa disponibilidad de equipo analítico y de reactivos para la reacción. Se diseñó una sonda de ácidos nucleicos que correspondía a cada conjunto de cebadores usando Primer Express ver. 2.0.0 (de Applied Biosystems Inc.).

- 45 Con respecto a los compuestos de marcado para las sondas de ácidos nucleicos, se usó el FAM (de Applied Biosystems Inc) para el fluoróforo y se uso el TAMRA (de Applied Biosystems Inc.) para el desactivador de fluorescencia.

2. Extracción del DNA utilizado como molde en la PCR

Se prepararon muestras de DNA de molde usando semillas procedentes de varias plantas. Las especies de plantas se exponen en la Tabla 3 que figura más adelante.

- 50 La superficie de las semillas del trigo, otras plantas Poaceae, plantas Fabaceae, y así sucesivamente, se lavó con una solución al 1,0% del tensioactivo SDS seguido de lavado a fondo con agua destilada y después se sometió a liofilización. Estas semillas fueron molidas finamente utilizando un aparato Multi-Beads Shocker (de Yasui Kikai Corporation) o un molino ultracentrífugo (de Retsch).

Se extrajo el DNA genómico de cada muestra molida usando un kit DNA Plant Mini (de QIAGEN). El procedimiento de extracción se llevó a cabo usando un método tomado de la publicación DNA Plant Mini Handbook, al que se habían añadido algunas modificaciones. Así, la muestra molida se suspendió en una solución mixta de solución tampón API y RNase A y Proteinase K y esta solución se mantuvo durante 2 horas en una capa de reacción calentada a 37°C. Después de esto, se llevó a cabo el procedimiento operativo según el Handbook.

Para la Proteinase K, se añadió 5 µl de una solución de Proteinase K (de TAKARA BIO INC.) de 20 mg/ml, por 0,1 g de la muestra molida. Esta cantidad de adición puede cambiarse a una cantidad más apropiada dependiendo del tipo y de la condición de las semillas.

El DNA extraído se sometió a medida de la absorbancia en 230, 260, 280 y 320 nm usando un espectrofotómetro, con objeto de determinar su pureza y su concentración y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Esto fue seguido por la adición de agua pura o tampón TE para diluir a 20 ng/µl obteniendo la solución de DNA de molde para la PCR.

3. PCR y método de detección del producto de amplificación de PCR

AmpliTaq (marca comercial registrada), Gold DNA Polymerase (de Applied Biosystems Inc.) y los reactivos proporcionados con ello se usaron para la PCR, y se preparó una solución de reacción PCR con la composición que sigue.

Así, se preparó una solución mezclando a fondo 2,5 µl de tampón II de PCR, 2,5 µl de mezcla de dNTP 2 mM, 1,5 µl de cloruro magnésico 25 mM, 0,125 µl de AmpliTaq Gold DNA Polymerase 5 unidades/µl, 2 µl de conjunto de cebadores 2,5 µM y 13,875 µl de agua estéril, y esta solución se llevó a un total de 25 µl mediante la adición de 2,5 µl de la solución de DNA de molde de 20 ng/µl.

Se usó un aparato 2720 Thermal Cycler (de Applied Biosystems Inc.) para el dispositivo de amplificación de PCR, y se emplearon las condiciones de reacción expuestas en la Tabla 1 que figura seguidamente. La temperatura de reasociación se basó en el valor Tm de los cebadores individuales, determinado mediante el procedimiento operativo de cálculo descrito previamente. y se confirmó experimentalmente con objeto de establecer la temperatura óptima para cada conjunto de cebadores utilizado en la PCR

Para llevar a cabo la electroforesis del producto de amplificación de PCR, se mezclaron cantidades apropiadas de la solución de reacción PCR y de un tampón de carga, y esta mezcla se cargó en un gel de agarosa al 3%.

Después de la electroforesis se llevó a cabo tinción con bromuro de etidio y se evaluó la presencia/ausencia de trigo común en la muestra confirmando un producto de amplificación de PCR de tamaño óptimo debido al conjunto de cebadores particular. La validez de la PCR se comprobó también en este punto, basándose en la presencia/ausencia de bandas de amplificación para el testigo negativo y el testigo positivo.

Tabla 1. Condiciones de reacción de la PCR

primera etapa	comienzo de la reacción	95°C	10 minutos
segunda etapa (40 ciclos)	desnaturalización	95°C	30 segundos
	reasociación	55°C, 60°C, o 56°C*	30 segundos
	extensión	72°C	30 segundos
tercera etapa	extensión	72°C	7 minutos
cuarta etapa	almacenamiento	4°C	--

* la temperatura de reasociación (hibridación de ácidos nucleicos) variaba con el conjunto de cebadores utilizado, y la temperatura de reasociación se fijó en 55°C para el conjunto de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, el conjunto de SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 y el conjunto de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, a 60°C para el conjunto de SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, y a 56°C para el conjunto de SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 (refiérase a la Tabla 2 que figura más adelante)

4. Detección de trigo común mediante los conjuntos de cebadores individuales

Los conjuntos de cebadores 1 a 4, que habían sido diseñados usando el SSII-D (SEQ ID NO:12) codificado en el genoma D del trigo como la secuencia parental, y el conjunto de cebadores 5, que se diseñó usando el SSII-A (SEQ ID NO:14) codificado en el genoma A del trigo como la secuencia parental, se exponen en la Tabla 2 que figura seguidamente.

ES 2 500 940 T3

- 5 La secuencia de bases de SEQ ID NO:1 es la secuencia en las posiciones 4015 a 4037 del gen SSII-D del trigo; la secuencia de bases de SEQ ID NO:2 es la secuencia complementaria a las posiciones 4142 a 4122 del gen SSII-D del trigo; la secuencia de SEQ ID NO:3 es la secuencia en las posiciones 4469 a 4487 del gen SSII-D del trigo; la secuencia de SEQ ID NO:4 es la secuencia complementaria a las posiciones 4555 a 4531 del gen SSII-D del trigo; SEQ ID NO:7 es la secuencia en las posiciones 937 a 955 del gen SSII-D del trigo; y SEQ ID NO: 8 es la secuencia complementaria a las posiciones 1080 a 1061 del gen SSII-D del trigo. Las secuencias de SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10 corresponden, respectivamente, a las secuencias de la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4 descritas en la Solicitud de Patente Japonesa abierta a la inspección pública, No. 2009-5588

10

Tabla 2

Conjunto de cebadores	SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia	Secuencia de bases
1	1	SSII-D4015U	5'-CAA CAT CCG CAA ATA GTG AGC AT-3'
	2	SSII-D4142L	5'-GGC TAG GTC GGG CTC TAT GAG-3'
2	3	SSII-D4469U	5'-TCC TCG ACC TCC CAT TCC A-3'
	4	SSII-D4555L	5'-CCG GTG TTA GTT CTA TGA TGA TTC G-3'
3	5	SII-D1769U	5'-CAC CAT CAG TGA AGG AAT GAA TG-3'
	6	SSII-D1889L	5'-GGC GAT ATT TGG TAC CTA ATT GAA G-3'
4	7	SSII-D937U	5'-TCC GTT GTC CCA GCT GAG A-3'
	8	SSII-D1080L	5'-TGG CTT TGG AGC TTC TTC GA-3'
5	9	SSII-A3118U	5'-GGA TGG AAA TCT GGT GTT T-3'
	10	SSII-A3231L	5'-ACC ATA ATG GAC CGA GTG TAC-3'

- 15 Se realizó la PCR según el procedimiento operativo descrito anteriormente en "3. PCR y método de detección del producto de amplificación de PCR" usando esos conjuntos de cebadores y muestras de DNA de molde obtenidas como se ha descrito anteriormente, procedentes de plantas diferentes. Los resultados de la presencia/ausencia de un producto de amplificación de PCR de tamaño óptimo, se indican por + y - en la Tabla 3 para cada conjunto de cebadores

Tabla 3

Muestra de las especies de plantas	No.	Región de producción de las especies de plantas	Conjunto de cebadores				
			1	2	3	4	5
trigo común	1	Japón	+	+	+	+	+
	2	Japón	+	+	+	+	+
	3	Estados Unidos	+	+	+	+	+
	4	Canadá	+	+	+	+	+
	5	Australia	+	+	+	+	+
trigo duro	6	Canadá	+	+	-	+	+
	7	Canadá	+	+	-	+	+
	8	Estados Unidos	+	+	-	+	+
cebada	9	Japón	-	-	-	-	-
	10	Japón	-	-	-	-	-
	11	Japón	-	-	-	-	-
centeno	12	Canadá	-	-	-	-	-
	13	Alemania	-	-	-	-	-
alforfón	14	Japón	-	-	-	-	-
arroz	15	Japón	-	-	-	-	-
maíz	16	Estados Unidos	-	-	-	-	-
soja	17	Japón	-	-	-	-	-

5 El conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L:SEQ ID NOS:5/6) proporcionó un producto de amplificación de PCR de la longitud deseada solamente con las muestras de trigo común y no proporcionó producto de amplificación de PCR con ninguna de las otras especies de plantas, es decir, trigo duro, cebada, centeno, alforfón, arroz, maíz y soja. Como resultado, se puso de manifiesto que este conjunto de cebadores reconoce específicamente trigo común.

Por otra parte, los otros conjuntos de cebadores, proporcionaron también un producto de amplificación de PCR con las muestras de trigo duro.

10 5. Evaluación del límite de detección de la PCR

El límite de detección semicuantitativa de DNA para el trigo común se examinó por PCR utilizando el conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L:SEQ ID NOS: 5/6), que proporcionó una detección específica, excelente, del trigo común. Usando una solución de DNA de esperma de salmón como la reserva de dilución, DNA genómico extraído de trigo común se diluyó en serie para proporcionar 20 ng/μl, 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 50 pg/μl, 10 pg/μl y 1 pg/μl.

Se llevó a cabo PCR usando 2,5 µl de la solución mencionada como la solución de DNA de molde y empleando el procedimiento operativo descrito anteriormente en “3, PCR y método de detección del producto de amplificación de PCR” y 5,0 µl de la solución de PCR se sometió a electroforesis. Los resultados de la detección se exponen en la FIG. 1.

5 El límite de detección para el conjunto de cebadores 3, utilizando una solución de DNA de trigo común como molde, fue 50 pg/µl. Esto puso de manifiesto que podía detectarse DNA genómico de trigo común usando el conjunto de cebadores 3 con una alta sensibilidad de 50 pg/µl, por PCR.

6. Confirmación de la detección específica de trigo común por PCR cuantitativa

10 Se investigó la aptitud para detectar específicamente trigo común en la PCR cuantitativa utilizando el conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L:SEQ ID NOS: 5/6), que detecta específicamente trigo común, y una sonda de ácidos nucleicos en combinación con ese conjunto.

Los DNAs extraídos de un total de cinco muestras de interés, a saber, trigo común, trigo duro, cebada, arroz y alforfón, se utilizaron como los moldes de DNA. La validez de la PCR cuantitativa se confirmó en este caso por la presencia/ausencia de una señal de amplificación empleando como blanco agua estéril exenta de DNA de molde.

15 Se usó para la PCR cuantitativa la TaqMan Universal PCR Master Mix (de Applied Biosystems Inc.) y se preparó una solución de reacción PCR cuantitativa con la composición que sigue. Así, se preparó una solución mezclando a fondo 12,5 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), 0,5 µl de conjunto de cebadores 25 µM, 0,5 µl de sonda de ácidos nucleicos 10 µM, y 9 µl de agua estéril, y esta solución se llevó a un total de 25 µl mediante la adición a la misma de 2,5 µl de la solución de DNA de molde. Se emplearon las soluciones siguientes para la solución de DNA e de trigo empleada como molde:: soluciones de DNA de trigo preparadas por dilución en serie, usando una solución de DNA de esperma de salmón como diluyente, de DNA genómico del trigo para proporcionar 29 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl, 50 pg/µl, 10 pg/µl, y 1 pg/µl. Se usó una solución de DNA diluida a 10 ng/µl con una solución de DNA de esperma de salmón, para el trigo duro, cebada, arroz y alforfón. La sonda de ácidos nucleicos que se empleó en esta PCR cuantitativa se expone en la Tabla 4.

25 Tabla 4. Secuencia de la sonda de ácidos nucleicos

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia	Secuencia de bases
11	SSII-D-1797T	5'-TAC CCG ATC GAC CGT TTT GCC CA-3'

El extremo 5' de esta sonda de ácidos nucleicos se modificó con FAM y su extremo 3' se modificó con TAMRA.

30 La PCR cuantitativa se llevó a cabo en el, presente caso utilizando un Rotor-Gene 3000 (de Corbett Research) como el equipo instrumental para realizar la PCR cuantitativa, pero los mismos resultados han sido obtenidos utilizando un equipo de realización de PCR cuantitativa procedente de otras firmas.

35 Las condiciones de reacción fueron las siguientes: la solución de reacción se mantuvo durante 10 minutos a 95°C, después de lo cual se repitieron 45 ciclos donde 1 ciclo consistía en 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. La cantidad de fluorescencia de cada pocillo de reacción se midió continuamente con el transcurso del tiempo durante el proceso de la reacción, y como resultado pudieron determinarse tubos en que había habido un aumento de la cantidad de fluorescencia una vez completada la reacción, analizando la variación con respecto al tiempo de la cantidad de fluorescencia de cada tubo de reacción. La sonda de ácidos nucleicos que se ha hibridado con la secuencia de bases diana, se degrada durante la etapa de la reacción de extensión de DNA y, acompañando a este hecho, la base marcada fluorescente es liberada, y la cantidad de fluorescencia aumenta a medida que progresa la reacción de amplificación de la PCR. Por tanto, un aumento en la cantidad de fluorescencia significa que está teniendo lugar una reacción de amplificación de PCR.

45 La FIG. 2 proporciona los resultados de una PCR cuantitativa llevada a cabo utilizando DNA extraído de trigo común para el molde. Las flechas de la figura indican las curvas de amplificación de la PCR cuantitativa obtenidas usando las diferentes concentraciones del DNA de molde. Se observaron señales de amplificación excelentes para la combinación del conjunto de cebadores 3 con la sonda de ácidos nucleicos con SEQ ID NO:11, y el límite de detección fue 50 pg/µl. El número de ciclos requerido para que estas señales de amplificación alcancen la línea umbral, residía en una relación lineal con el logaritmo de la concentración de DNA de molde y, por tanto se puso de manifiesto de este modo que tenía lugar una PCR cuantitativa totalmente adecuada.

50 Además, la FIG. 3 expone los resultados de PCR cuantitativa con DNAs de molde extraídos de trigo común, trigo duro, cebada, arroz y alforfón. Aun cuando se obtuvo una señal de amplificación para el trigo común, no se obtuvo una amplificación de señal para el trigo duro, la cebada, el arroz y el alforfón.

Los resultados expuestos en las FIGS. 2 y 3, muestran que la combinación de conjunto de cebadores/sonda de ácidos nucleicos antes indicada, puede proporcionar una detección cuantitativa de trigo común apropiada y altamente sensible.

5 7. Confirmación de la detección específica de trigo común y trigo duro mediante la combinación de dos tipos de PCR cuantitativa.

Se confirmó si el trigo común y el trigo duro de una mezcla podía cuantificarse, cada uno, llevando a cabo sobre la misma muestra, una PCR cuantitativa utilizando un conjunto de cebadores que detecta específicamente DNA de trigo y una sonda de ácidos nucleicos que reconoce específicamente esa secuencia de bases y una PCR cuantitativa que utiliza un conjunto de cebadores que detecta específicamente DNA de trigo común y una sonda de ácidos nucleicos que reconoce específicamente esa secuencia de bases.

10 Para las PCRs cuantitativas, se puso en práctica una PCR cuantitativa según el procedimiento operativo anteriormente descrito, utilizando el conjunto de cebadores 5 (SSII-A3118U/3231L:SEQ Id BOS:9/10), que detecta específicamente DNA de trigo, y la sonda de ácidos nucleicos indicada más adelante SSII-A ex7-T82 que correspondía a este conjunto de cebadores, y se realizó una PCR cuantitativa según el procedimiento operativo antes descrito que usa el conjunto de cebadores 3 (SSII-D1769U/1889L:SEQ ID NOS:5/6), que detecta específicamente DNA del trigo común, y la sonda de ácidos nucleicos con SEQ ID NO:11 (SSII-D-1797T).

Se prepararon como muestras los dos tipos siguientes de soluciones de DNA de molde.

(1) "Muestras de soluciones de DNA mixtas" preparadas mezclando una solución de DNA genómico de trigo común y una solución de DNA genómico de trigo duro, para proporcionar razones de 100:0, 50:50, 5:95, 0,5:99,5, 0,25:99,75 y 0:100 para la razón volumétrica, llevándose la concentración total de DNA a 20 ng/μl.

(2) "Muestras de harinas mixtas" preparadas mezclando harina de trigo común y harina de trigo duro, para obtener razones de 100:0, 50:50, 5:95, 0,5:99,5, 0,25:99,75 y 0:100 para la razón de masas, extrayendo de ellas el DNA genómico; y ajustando la concentración de DNA a 20 ng/μl.

La sonda de ácidos nucleicos que se empleó para la cuantificación del DNA del trigo se indica en la Tabla 5.

25 Tabla 5. Secuencia de la sonda de ácidos nucleicos

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia	Secuencia de bases
13	SSII-A ex7-T82	5'-CTC CTG CCT GTC TAT CTG AAA GCA T-3'

El extremo 5' de esta sonda de ácidos nucleicos se modificó con FAM y su extremo 3' se modificó con TAMRA.

30 Los resultados de la PCR cuantitativa que detecta específicamente DNA de trigo, se exponen en las FIGS. 4 y 5. La FIG. 4 expone los resultados del uso de las "muestras de soluciones de DNA mixtas" como DNA de molde, mientras que la FIG. 5 expone los resultados del uso de las "muestras de harinas mixtas" como DNA de molde. Las flechas de las figuras indican las curvas de amplificación de la PCR cuantitativa, obtenidas para las diferentes concentraciones de DNA de molde. Según los resultados de las FIGS. 4 y 5 se apreciaron señales de amplificación excelentes para todos los DNAs de molde utilizando la combinación de conjunto de cebadores 5 y la sonda de ácidos nucleicos con SEQ ID NO:13, y estas señales de amplificación fueron indicadas para trazar la misma curva".

35 Los resultados de la PCR cuantitativa que detecta específicamente DNA de trigo común, se exponen en las FIGS. 6 y 7. La FIG. 6 expone los resultados del uso de las "muestras de soluciones de DNA mixtas" como DNA de molde, mientras que la FIG. 7 expone los resultados del uso de las "muestras de harinas mixtas" como DNA de molde. Las flechas de las figuras indican las curvas de amplificación de la PCR cuantitativa obtenidas para las diferentes concentraciones de DNA de molde. Según los resultados indicados en las FIGS. 6 y 7, se observaron señales de amplificación excelentes utilizando la combinación de conjunto de cebadores 3 y la sonda de ácidos nucleicos con SEQ ID NO:11 para las muestras con razones de mezcla de trigo común: trigo duro de 100:0, 50:50, 5:95, 0,5:99,5 y 0,25:99,75, y se puso de manifiesto que una muestra con una mayor concentración de trigo común daba una señal de amplificación mayor y resultaba en un incidente más rápido de la curva de amplificación ascendente. Sin embargo, no se obtuvo señal de amplificación con la muestra de trigo común: trigo duro de razón de mezcla 0:100.

40 Utilizando los resultados indicados en las FIGS. 6 y 7, se prepararon gráficas, expuestas respectivamente en las FIGS. 8 y 9, representando la proporción de trigo común de la mezcla en el eje horizontal y representando el Ct (el ciclo umbral, o el número de ciclos para alcanzar la línea umbral) en el eje vertical. En ambas FIGS. 8 y 9, se ha puesto de manifiesto que el valor Ct había experimentado una disminución proporcional a medida que aumentaba la razón de mezcla del trigo común en el DNA de molde y, por tanto, que el trigo común podía determinarse cuantitativamente.

Texto libre del listado de secuencias

- 5 SEQ ID NO:1 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:2 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:3 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:4 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:5 : Cebador de la PCR
- 10 SEQ ID NO:6 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:7 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:8 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:9 : Cebador de la PCR
- SEQ ID NO:10 : Cebador de la PCR
- 15 SEQ ID NO:11 : Sonda de ácido nucleico para la PCR, modificada: 1-FAM-a, 23-a-TAMRA
- SEQ ID NO:12 : Secuencia del gen de wSSII-D de Triticum aestivum
- SEQ ID NO:13 : Sonda de ácido nucleico para la PCR, modified: 1-FAM-a, 25-a-TAMRA
- SEQ ID NO:14 : Secuencia del gen de wSSII-A de Triticum aestivum

Listado de Secuencias

- 20 <110> Incorporated Administrative Agency National Agriculture and Food Research Organization;
Nippon Flour Mills Co., LTD.;
Nisshin Seifun Group Inc.
- 25 <120> Método para la detección cualitativa y cuantitativa de trigo común
- <130> Y1R-0704
- <150> JP2009-289340
- 30 <151> 2009-12-21
- <160> 14
- <210> 1
- 35 <211> 23
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 40 <223> Cebador de la PCR
- <400> 1
- caacatccgc aaatagtgag cat** **23**
- 45 <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
- <223> Cebador de la PCR
- <400> 2
- 55 **ggctaggtcg ggctctatga g** **21**
- <210> 3
- <211> 19
- 60 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> Cebador de la PCR		
	<400> 3		
5		tcctcgacct cccattoca	19
	<210> 4		
	<211> 25		
10	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de la PCR		
15		<400> 4	
		ccggtgtag ttctatgatg attcg	25
20	<210> 5		
	<211> 23		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador de la PCR		
	<400> 5		
30		caccatcagt gaaggaatga atg	23
	<210> 6		
	<211> 25		
	<212> DNA		
35	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de la PCR		
40	<400> 6		
		ggcgatattt ggtaccta at tgaag	25
	<210> 7		
45	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador de la PCR		
	<400> 7		
		tcogttgtcc cagctgaga	19
55	<210> 8		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador de la PCR		

<400> 8

tggttttggg gtttttcca 20

5 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador de la PCR

<400> 9

ggatggaaat ctggtgttt 19

15

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador de la PCR

25 <400> 10

accataatgg accgagtga c 21

30 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <221> base_modificada
 <223> Sonda para la PCR, 1-FAM-a, 23-a-TAMRA

<400> 11

40 **taccgatcg accgttttgc cca** 23

<210> 12
 <211> 7010
 45 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 50 <222> unión(236..499, 604..1309, 1398..1462, 2363..2440, 2530..2640, 2738..2782, 3163..3336, 6054..7010)
 <223> gen de la wSSII-D de Triticum aestivum para almidón sintasa II-D, cds completo.

<400> 12

55

ES 2 500 940 T3

gggggcccgtt	cgtacgtacc	cgcccctcgt	gtaaagccgc	cgccgtcgtc	gcggtcccc	60
gctcgcggcc	atttcttogg	cctgaccccg	ttcgtttacc	cccacacaga	gcacactcca	120
gtccagtcga	gcccactgcc	accgogctac	tctccactcc	cactgccacc	acctcgcct	180
gcgcccgcgt	ctgggcccga	caaccocgga	accgtaccat	ctcccgcacc	gatccatgtc	240
gtcggcggtc	gcgtccgccg	catccttctc	ogcgtccgg	tcagcctccc	ccgggagatc	300
acgcaggcgg	gcgaggggtga	gcgcgcagcc	accccacgcc	ggggccggca	ggttgcaactg	360
gccgcgcgtg	ccgcccgcagc	gcacggctcg	cgacggagct	gtggcggcgc	tcgcccgcgg	420
gaagaaggac	gcgggggatcg	acgaocgcgc	cggtccgtg	aggcagcccc	gcgcaactccg	480
cggtggcgc	gccaccaagg	tagttagtta	tgaccaagtt	atgaocgcgtg	cgcgccctc	540
gagatcatcg	tcgtctcgct	cacgaattgt	ttatttatac	aaaacgcacg	cccgctgtg	600
caggtcgcgg	agcgaaggga	tcccgtcaag	acgtccgacc	gcgacgcgcg	ggaagggggc	660
gggcgcgtccc	cgcccgcagc	gaggcaggac	gcccgcgcgc	cgccgagtat	gaacggcatg	720
ccggtgaacg	gcgagaacaa	atctaccggc	ggcggcggcg	cgactaaaga	cagcgggctg	780
cccacgcccg	cacgcgcgcc	ccatccgtcg	accagaaca	gagcaccggt	gaacggtgaa	840
aacaaagcta	acgtcgcctc	gcgcocgacg	agcatagccg	aggcgcgcgc	ttcggattcc	900
gcagctacca	tttccatcag	cgacaaggcg	ccggagtcgg	ttgtcccagc	tgagaagacg	960
ccgcccgtcgt	ccggctcaaa	tttcgagtc	tggcctctg	ctcccgggtc	tgacactgtc	1020
agcgacgtgg	aacaagaact	gaagaagggt	gcggtcgttg	togaagaagc	tccaaagcca	1080
aaggctcttt	cgccgcctgc	agccccgcgt	gtacaagaag	acctttggga	tttcaagaaa	1140
tacattggtt	tcgaggagcc	cgtggaggcc	aaggatgatg	gccgggctgt	cgcatatgat	1200
gcgggctcct	ttgaacacca	ccagaatcac	gactccggac	ctttggcagg	ggagaatgtc	1260
atgaacgtgg	tcgtcgtggc	tgctgagtg	tctccctgg	gcaaacaggg	ctggacatt	1320
acctcttcag	tctctcttc	tgttgttc	aaaactttgc	tcgaattact	cataagaaca	1380
aacattgtgt	tgcatagggtg	gtctgggaga	tgttgcgggt	gctctgccc	aggctttggc	1440
aaagagagga	catcgtgtta	tggtactaca	agctttcatt	taactctgtt	gggtccatat	1500
gttcgaataa	tatcagtgag	tagtataatg	ttattaagtg	caagacatga	aagtgttctt	1560
ttgtcatact	ccctccgtaa	attaatataa	gagcgtttag	attactactt	tagtgatect	1620
aacgctctta	tagtagttta	cagacggagt	agagtatttc	atagccaacc	ctggaggtta	1680
ggttgctgag	gcctactggg	tgggggaggg	ggtttgaaac	aagtgggtgt	tagcagccag	1740
atctcaca	gaaggaggct	gataaccaca	ccatcagtg	aggaatgaat	gtcgggtacc	1800
cgatcgaccg	ttttgcccaa	cgtcgggttt	accgcocct	tagatccgaa	taagttagttc	1860
ctatcttcaa	ttaggtacca	aatatcgcca	gcgcccgtgt	gtgtatttat	actactggat	1920
gatcaattta	tcaacatttc	cggttaatgg	ttctatcat	attcactgta	attgttagta	1980
aacagtagat	gtttgtaatg	tagatgatgg	ataaatgtat	gttgtcgagc	tttcatttca	2040
atgcaatttt	gattgggagc	tagtttcgcg	gttcggttag	agccatcaaa	accccagaat	2100
ttttgggagt	tggtctgtga	gagagggttt	tggggagtta	actttcggga	ttcagttaga	2160
gacgctctta	ctagttccag	taaagagtaa	actatttct	gcaggcatcc	caattattct	2220
gtagaaatta	gaagtggaaa	atagttatgg	tatcatataa	accatatatt	attcaaaatc	2280
tagaatcatg	gacttggtca	gactttgata	atctgaaatt	ttaaatttga	tgataattga	2340
gaaatgatcc	ttctatctt	aggttgtggt	accaaggat	ggggactatg	aagaagccta	2400
cgatgtcggg	gtccgaaaat	actacaaggc	tgctggacag	gtaagcaaaa	atgcaatcga	2460
aggggagctg	aaattttatt	gcttattgtc	ataataatc	aatttttaag	tgtttttttt	2520
gtcctgcagg	atatggaagt	gaattatttc	catgcttata	tcgatggagt	tgattttgtg	2580
ttcattgacg	ctcctctctt	ccgacaccgt	caggaagaca	tttatggggg	cagcagacag	2640

gttaatcttc	tatatgttgg	tgtttgattg	cactgataaa	ctgagaacaa	gccaaggcct	2700
actgactggc	atatgattac	acattttatt	ttttcaggaa	attatgaagc	gcatgatttt	2760
gttctgcaag	gccgctggtg	aggtatctct	ccaactcaat	tgacaacct	ttaccactat	2820
acaattatgt	gtatgcatgt	atttcaacag	atacataatc	tcttgtgaag	tgcatatata	2880
ctaataacat	ttcaataacct	tacatgcaca	tttggccaag	cgttatgatt	taacttctga	2940
taatctattg	cactgatgaa	caattatctt	gatgatcctt	gttacttcat	cgttatgttt	3000
ccatgttctc	ttcaccgcga	attgatttgg	aaatagcatt	tccacctgcc	acaaacaata	3060
atatacactc	ctactttcat	ccaatttaga	tattttcgta	cttggcatat	catoccatta	3120
aatattattg	gtccatcatt	tttattcctc	tataatttgc	aggttccatg	gcacgttcca	3180
tgccggcggg	tcoccttatgg	ggatggaaat	ctggtgttta	ttgcaaatga	ttggcacacg	3240
gcactcctgc	ctgtctatct	gaaagcatat	tacagtgacc	atggtttgat	gcagtacact	3300
cggtccatta	tggtgataca	taacatcgct	caccaggttc	cttttctcct	aatcttgatt	3360
tttctctagt	ctctactatt	tactccacat	tgtttgagga	aactaaacgg	gttgcaaaat	3420
tatgatggct	tatgaaagtt	atagtcttat	agaggtaaat	gcaccagtg	tgcttgaact	3480
tgtcacgcgt	gttcactttg	gtgcttacag	ttgtagacta	tgaaaaacgg	gtgcaaaaac	3540
ttgctgttgt	gtgccatacg	gtgcattttc	cgtatgtagg	agtcaaacgt	tgocctatgtg	3600
gcctctctat	tcocgtctat	agctgttaga	ccgtgcttac	gtcgcctatg	ggcccacaca	3660
ctctctatct	acatgtgggc	cccacttgtc	aacctatgac	ataaataaat	ggaaatttat	3720
aataaaaatg	atggcctggg	gtcttgaaaa	tgggacctcg	caggatgtct	ggtagccagc	3780
acgccctaaa	cattaatccc	ctatgcactt	catgtcttgt	gtatgtgtgt	gtctgtgtgg	3840
ggaggggggg	ggtatgtatg	ctatatacct	ttgctccaag	gctaccatcc	tcaacaagcc	3900
caactccgct	tcaacacggc	cagcgccttc	atgatggccc	agggtgctcc	caccatcgct	3960
caaagcggca	acgtcgttgt	catgaccatc	caccaaccca	acacacaaaa	tccctcaacat	4020
ccgcaaatag	tgagcatgce	ctctttgtcc	tttccctcog	tacccaacaa	tgtcttgata	4080
acccttgagg	ctgcacaagt	tgtgaccatc	gcctgogtgc	cctcatagag	cccgacctag	4140
ccggaccggt	atagaagcct	acttgggagc	ccatacctcc	ctgcacatcc	tccctcttcc	4200
ccatagatcg	tgccgccatc	gcaaaccaac	ttctctctc	cttctcccac	tctggccggt	4260
tccccgcgog	cgaagctgca	atacatgccc	agttggccat	ggccctattc	cccaattgct	4320
cgcaactagga	ggtcctcctc	taagcctagc	acottttccc	ctcaccaatt	gcaagttggg	4380
gagccctcct	cgagctccct	acgtcggctg	cagttgcctg	ccgctcaac	tctgatccag	4440
acctcgttcc	cgtggcctcg	gagacatctc	ctcgacctcc	cattccacac	gtggcctggc	4500
gaggatcacc	gcatgttcat	ccatgtgaac	cgaatcatca	tagaactaac	accggagagg	4560
tcatcccgcac	ggcgtcgcac	tgttctctca	ttcccccaaa	gccgtgtcgc	gtcataatat	4620
aagacggact	tatttgtatc	ccttgggtca	toggttcaat	ggctatctct	ttctcctgtc	4680
tactgataag	tgggaccacc	acgccacaact	aagcccttcc	tttctcctac	ccgttgataa	4740
gtgggaccoca	caacacgtac	ttagccagag	agagaacatg	agcttgttgg	tgccacgctg	4800
gtaagccatc	tcagcagctc	taacggctac	aaacaacgga	tatggtgtca	cgtagcggtt	4860
tacgaatgga	aagtgcacac	tactgcacgc	gagagccaga	gocaggtttt	tgaccaggtt	4920
ttctgtatct	tacaactgcg	agcatcaaag	tgtacatatg	ccgaaccaa	gtgaacatgg	4980
tgagtcacat	cttttctggt	gcggtgggtg	gctcaaaagc	acccaatag	aagctattgc	5040
ctccgacact	gccaatcggg	tgccgaacca	tattgaagtg	gtgaggtcag	ttgcttgtgc	5100
tctgactact	aggtattgga	tgagggacat	aaaggatctc	ataaatattg	caatgttcat	5160
tcaaattctt	aacatttggc	aagcgttcca	tgatttccat	ctcccctaga	tcagagacac	5220
ttggtcgtgt	acaactgaatt	tctcaggctc	cttctcgtct	aaatccgcat	atgtagctca	5280
cttcaatgac	ttgcctttgg	tccagctaac	gccatttggc	tagcaaat	ttcatatggc	5340
tcgctctgog	caagaggatt	tgatcacagg	gcagacggc	tagacaaggt	cttccgcaca	5400
atgaacattg	agttttttga	tccgctcttc	ccgaagacac	ttgtgatctt	attacgagtt	5460
gtgccatttc	aaacatctgt	ctctccatgg	tgcocccagc	catagatgcc	ttgttctctg	5520
aatggtgggt	ttcagctagg	aacaggggtc	caccttcgga	caagaagttg	cgtagtttgg	5580
tcgtcttaac	tgcttgggtg	atltggaagg	aacacaacaa	cagtccttga	aggcaaaagt	5640
aattccttcc	atcaagttat	tagacggatc	aagtgtgatg	aatcctactg	gtacaatgcc	5700
ggtgctagtt	gcttggagtc	actatttggc	taggtcgtct	gccatccgc	tctgtgctaa	5760
gcgcttgggg	tcgcttttgc	tcaatttcta	ttttgtgttt	atgtgttttt	agtaatgtaa	5820
cctgaacttt	ctggactaag	tagaaaaaaa	ttctcctcca	taatgatcac	atacagttct	5880
cctgactggg	tcgaaaaaaa	aatgagaaca	tccgtggcaa	gtttaaagcac	caccgggtgca	5940
ttttatcctc	aaagcttat	acaacactga	catgcgcaat	tacatgcttt	ggtcagttat	6000
tccattcttc	ggtactccgt	tgggctaatt	ctttctcttc	atgttgcatg	cagggccgtg	6060
gccctgtaga	tgaattcccg	ttcaccgagt	tgcttgagca	ctacctggaa	cacttcagac	6120
tgtacgaccc	cgtgggtggt	gaacacgcca	actactcgc	cgccggcctg	aagatggcgg	6180
accaggttgt	cgtggtgagc	cccgggtacc	tgtgggagct	gaagacgggt	gagggcggct	6240
gggggcctca	cgacatcata	cggcagaacg	actggaagac	cogcggcatc	gtcaacggca	6300
tcgacaacat	ggagtggaac	cccaggtggg	acgccacct	caagtggac	ggctacacca	6360
acttctcctc	gaggacgctg	gactccggca	agcggcagtg	caaggaggcc	ctgcagcgcg	6420
agctgggctc	gcaggtccgc	gcgacgtgc	cgctgctcgg	cttcatcggc	cgctggacg	6480
ggcagaaggg	cgtggagatc	atcgcggagc	ccatgcctg	gatcgtgagc	caggacgtgc	6540

ES 2 500 940 T3

```

agctggtgat gctgggcacc gggcgccacg acctggagag catgctgcag cacttcgagc 6600
gggagcacca cgacaaggtg cgcgggtggg tggggttctc cgtgcgcctg gcgcaccgga 6660
tcacggcggg ggcggacgag ctctcatgc cctcccgggt cgagccgtgc gggctgaacc 6720
agctctacgc catggcctac ggcaccgtcc ccgtcgtgca cgcctcggc ggcctcaggg 6780
acaccgtgcc gccgttcgac cccttcaacc actccgggct cgggtggacg ttcgaccgcg 6840
ccgagggcga caagctgac gaggcgctcg ggcactgcct ccgcacctac cgagacttca 6900
aggagagctg gagggccctc caggagcggg gcatgtcgca ggacttcagc tgggagcacg 6960
ccgccaaagt ctacgaggac gtcctcgtca aggccaaagta ccagtgggtga 7010

```

5 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> base_modificada
 <223> Sonda para la PCR, 1-FAM-a, 25-a-TAMRA
 <400> 13

15 **ctcctgcctg tctatctgaa agcat** **25**

<210> 14
 <211> 6898
 <212> DNA
 20 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 25 <222> unión(247..510, 602..1307, 1396..1460, 2277..2354, 2444..2554, 2652..2696, 3080..3253, 5942..6898) <223>
 gen de la wSSII-A de Triticum aestivum para la almidón sintasa II-A, cds completo.

<400> 14

ES 2 500 940 T3

gggggcccgtt	cgtacgtacc	cgccccctcgt	gtaaagccgc	cgccgtcgtc	gdcgtcccc	60
gctcgcggcc	atttccccgg	cctgaccccg	tgcgtttacc	ccacagagca	cactccagtc	120
cagtccagcc	cactgcccgc	gcgtaactcc	ccactcccgc	tgccaccacc	tccgcctgog	180
ccgcgctctg	ggcggaggac	caaocccgcg	atcgtaccat	cgcccgcccc	gatcccggcc	240
gocgccatgt	cgtcggcggg	cgcgccggcc	gggtccttc	tgcgctcgc	ctccgcctcc	300
cccgggagat	cacgcaggcg	ggcggagggtg	agcgcgcgcg	caccccacgc	cggggcccggc	360
aggctgcact	ggccgcctgt	gcccgcgcag	cgcaaggctc	gcgacggagg	tgtggcccgg	420
cgcgccggcc	ggaagaagga	cgcgagggtc	gacgacgacg	ccgctcggc	gaggcagccc	480
cgcgcacgcc	gocgtggcgc	cgccaccaag	gtagttgggt	cgttatgact	tgctgtatgg	540
cgcgctgcgc	tcgagatcag	ctcacgaatt	gtttctacaa	aacgcacgcg	ctcgtgtgca	600
ggtcgcggag	cggagggatc	cogtcaagac	gctcgatcgc	gacgcgcggg	aaggtggcgc	660
gccggcaccg	ccggcaccga	ggcaggagcg	cgcccgtcca	ccgagtatga	acggcacgcc	720
ggtgaacggg	gagaacaaat	ctaccggcgg	cgcgggcggg	cccaaagaca	gocggctccc	780
cgcacccgca	cgcgccggcc	atccgtcgac	ccagaacaga	gtaccagtga	acggtgaaaa	840
caaagctaac	gtgcctcgc	cgccgacgag	catagccgag	gtcgtggctc	cggttccgc	900
agctaccatt	tccatcagtg	acaaggcgc	ggagtccgtt	gtcccagccg	agaagcccgc	960
gocgtcgtcc	ggctcaaatt	togtggctc	ggcttctgct	cccaggctgg	acattgacag	1020
cgatgttgaa	cctgaactga	agaagggtgc	ggctatcgtc	gaagaagctc	caaaccocaaa	1080
ggctctttcg	ccgcctgcag	cccccgctgt	acaagaagac	ctttgggact	tcaagaaata	1140
cattggcttc	gaggagcccg	tggaggccaa	ggatgatggc	tgggctggtg	cagatgatgc	1200
ggctccttt	gaacatcacc	agaaccatga	ttccggacct	ttggcagggg	agaacgtcat	1260
gaacgtggtc	gtcgtggctg	ctgaatgttc	tcocctggtc	aaaacaggca	tggacattac	1320
ctcttcagtc	tctcttcccg	ttgttcataa	aactttgctc	gaatcactca	taagaacaaa	1380
cattgtggtg	cataggtggt	cttggagatg	ttgcgggtgc	tctgcocaaag	gctttggcaa	1440
agagaggaca	togtgttatg	gtactgcagg	ctttcactta	actctgttga	gtccatattg	1500
togaataata	tcagtgattg	gcataatggt	attaagtgca	agacatgaaa	gtgttcttct	1560
gtagagtat	ttcatagcca	accctggagg	ttaggttgtt	ggggcctact	gggtgcggga	1620
gggggtttgc	aaaaagtggg	ggtagcagc	cggtttcac	aaataaggag	gctgataacc	1680
acgccatcag	tgaaggggat	gagtgctggg	taccgatcgc	accgttttgc	ccgacgtcag	1740
gtttacctgc	cctgtagatc	cgaataagta	gttccatccc	tcagttaagt	accaaatac	1800
gccagcacc	gtgtgtgtat	ttatagtact	ggatgatcaa	tttatcaaca	tttccggtta	1860
atggttgcta	tcatattcac	tgtaatgtt	agtaaaccagt	ggatggttgt	aatgtagatg	1920

atggctaaat	gtatgtttgc	aagctttcat	tttaaagaaa	atthttattgg	gagctagttt	1980
toggggtttg	ttagagocac	caaaacccca	gaatttttgg	gagttggcct	gtgacagagg	2040
gttttgggga	gttaactttc	gggattcagt	tagagacgct	cttactagtt	ccagtaaaga	2100
gtaaaactatt	ttctgcagtc	atcccaattg	ttctgtagaa	attaaaagta	gaaaatagtt	2160
gtggtatcat	ataaaccata	tattattcaa	aatctagaat	catggacttg	gctagacttt	2220
gatgatctga	aattttaaat	ttgatgataa	ttgagaaatg	atcctttota	tcttaggttg	2280
tggtagcaag	gtatggggac	tatgaggaag	cctacgatgt	cggagtcoga	aaatactaca	2340
aggctgctgg	acaggtaaag	gaaaatgcaa	tcaaagggga	gctgaaattt	caatgcttac	2400
tatcataata	aatcaatttt	aagtaaaaaa	atthgtcctg	caggatatgg	aagtgaatta	2460
ttccatgct	tatatgatg	gagttgattt	tgtgttcatt	gacgctecta	tcttcogaca	2520
ccgtcaggaa	gacattttat	ggggcagcag	acaggttaat	tttctatatg	ttggtgtttg	2580
attgcaactga	taaactgaga	ataagccaag	gcctactgac	tggcatatga	ttacacattt	2640
tattttttca	ggaaattatg	aagcgcagta	ttttgtctcg	caaggcgcct	gtcagaggtat	2700
cctctccaac	tcaattgaca	acctattacc	actatacaat	tatgtgtatg	catgtatttc	2760
aacagatacg	taatctccct	tgtgaagtgt	atatatacta	ataacatttc	aatacctcac	2820
atgcacattt	ggtcaagcgt	tatgatttaa	cttctgataa	tctattgcac	tgatgaacaa	2880
taattattgat	gatccttggt	acttcactgt	tatgthtatg	ttctcttcac	cggcgcattg	2940
atthttggaaa	tagcatttcc	acctgccaca	aacaataata	tatactccta	ctttcatcca	3000
atgtagatat	tttcgcactt	ggcatatcat	cccattaaat	attattggtc	catcattttt	3060
atcctctat	aatttgcagg	ttccttggca	cgthccatgc	ggcgggtgct	cttatgggga	3120
tggaaatctg	gtgthttatg	caaatgattg	gcacacggca	ctcctgcctg	tctatctgaa	3180
agcatattac	agggaccatg	gtttgatgca	gtacactcgg	tccattatgg	tgatacataa	3240
catcgcgcac	caggttccct	ttctcctaatt	cttgtthttt	ctctagtctc	tactattcac	3300
tccacattgt	ttgaggaaac	taaagggggt	gcaaaattat	gatggcttat	gaaagttatg	3360
gaggtaaatg	catcagtggt	gcttgaactt	gtcacgcctg	ttcactttgg	tgcttacaag	3420
tgtagactac	ggaaaactgg	tgcaaaaact	tggctattgt	gtgcaatacg	gtgtattttc	3480
cgtatgtagg	gtcaaatgth	gcctatgtgg	cattgtattc	ccgtctatag	atgttagacc	3540
gtgcctacat	cgccattggg	cccacacact	ccctattaca	tgtgggaccc	acttgtcagc	3600
ctatgacata	aataaaatgg	aaatttataa	taaaaatgat	ggcctggggg	cttgaaaatg	3660
ggacctogca	ggtatgocgc	tagccagcac	gcctaatca	ttaatccctt	atgcacttca	3720
gtatgtgtgt	gtctgtgtgt	ggagtccggg	gggggggggg	tatgtattct	tatactcttt	3780
gctctaagtc	tactattggc	gtgctagcac	cgccgggtct	ccatcaacac	cgacatcatc	3840
caogacccca	tccagctctt	cctcaacaag	cccactcca	gcctcaactc	gggcagcacc	3900
ttcatgggtg	cctaggtgct	ctgcaccatc	gctcgaagtg	gcaacgtogt	tgtcatgacc	3960
atccaccaac	ccaacacgca	aaatcctcaa	catcatttga	cagtgagcat	gcccctcttg	4020
tcaattccccc	ctcataccca	aacctgtctc	gataaccctt	ggagctgcac	aagttgtgac	4080
catogcctgc	gtcgtctgac	aacgcctgac	ctagccggac	cattatagaa	gcctgccttg	4140
ggagocccata	cctccctgca	catcctcctc	ttccccata	gaccgtgocg	ccatcgcaaa	4200
tcaactctctc	ctctcctcct	tctcctgctc	tggccgtttt	ccccgcgcgc	aagctgcatt	4260
ccatggcgag	ttggccatgg	ccctattccc	caattgtctg	cactaggagg	tcctccttga	4320
agcctagcac	ctttccccct	cactaattgc	aagttgggga	gcccctcacg	agctccctac	4380
attggccgta	gtcgcctgcc	gcctcaactc	tggctcagac	ctcgttcccg	tggcctcgac	4440
gacatctcct	cgacctccca	ttccacacgc	ggcctggaga	ggatcaccgc	atgttcatcc	4500
atccgaccgg	aatcatcata	gaaccaacgc	cagagaggtc	atcccgacga	cgtcgcactg	4560
ttcctctatt	tcccccaagc	tgtgtogcgt	cataatataa	gacgggottg	tttgtatctc	4620
taggggtcat	cgggttcaat	ggctagctca	tgcattggacc	tgaactttagg	tcccagtttc	4680
gaacccccgc	gtcacatata	tttatttggc	atthtttct	cctatctact	aataagtggg	4740
accacacacat	catactaagc	cctttttgtc	tcttgctgc	tgataagtgg	gaccacacag	4800
caataacttag	ccagagagag	aacatgagct	tgttgggtgcc	gcgttggcaa	gccacgccag	4860
cagttctaac	ggctacaaac	agaggatatg	gtgtcacatc	aacgtgcaga	gcgtttacga	4920
atggaaagtg	tactatatgc	acacaagagc	cagagccagg	tttttgcacc	agtttttgt	4980
attctacaac	tgcgagcacc	aaagtgtaca	tgccgaacca	aagtgaacac	ggcaggtcca	5040
ttcttttctg	gtacgatggg	tggctaaaag	acacoccaat	agaagctatc	acctcggaca	5100
ttgccaaattg	ggtgccgaac	tacattaaag	tggcaaggtc	agttgattgc	gctatgtgt	5160
ggatcagggga	cataaacgat	tccataaata	ttgcaatggt	cattcaaat	cttaacattt	5220
gcgaggogct	tcatgatttc	catctccctc	atatcagaga	catttgggtg	tgtacactaa	5280
atthctcagg	tcacttctcg	tctaaatccg	catatgtagc	tcacttcaat	gacttgactt	5340
tggctccagct	aacgccattt	ggcgtctctg	ggccccttg	cgtagcaatt	ttttcatatg	5400
gctcgtccg	cgcaatagga	tttggatcac	gggcagacgc	gctagatgag	gtcttccaca	5460
caatgaacat	tgcgttcttt	gctctgctct	tccagaagac	acttgtgatt	ttattacgag	5520
ttgtgccata	gatggccgtg	ggtttcagct	aggaacaggg	tgtcaccttc	ggacaagaag	5580
aagttgcata	gtttggctgt	cttaactgct	tggctgattt	ggaaggagca	caacaacagt	5640
ctthtgaagc	aaagctaat	ccctcgatca	agttattaga	cggatcaaat	gtggtacagt	5700
gccatggcta	gthgcttggg	gtcactttta	agctaggtcg	cttgccatca	cgctttgtgt	5760
taagcgttg	gggtcgttt	tgtccaattt	gtatthttgt	gthtatgtgt	tttagttatg	5820

ES 2 500 940 T3

tagcctgaac	tttctggact	tagttttttc	ctctataatg	atcacatgct	ttggtcagtt	5880
attcctttct	tgggtactcc	gttgggctaa	ttctttctct	tgattgatgt	tgtatatgca	5940
gggocgtggc	ccagtagatg	aattcccggt	caccgagttg	cctgagcact	acctggaaca	6000
cttcagactg	tacgaccccg	tgggtggtga	gcacgccaac	tacttcgccg	ccggcctgaa	6060
gatggcggac	caggttgctg	tgggtgagccc	cggttacctg	tgggagctca	agacgggtgga	6120
gggcggtctg	gggcttcacg	acatcatacg	gcagaacgac	tggaagacct	gcggcatcgt	6180
caacggcatc	gacaacatgg	agtggaacct	cgaggtggac	gtccacctcc	agtccgacgg	6240
ctacaccaac	ttctccctga	gcacgctgga	ctccggcaag	cggcagtgca	aggaggccct	6300
gcagcgcgag	ctgggcctgc	aggtccgcgc	cgacgtgccg	ctgctcggct	tcctcggccg	6360
cctggacggg	cagaagggcg	tggagatcat	cgccgacgcc	atgccctgga	tcgtgagcca	6420
ggacgtgcag	ctggtcatgc	tgggcaaccg	ccgccaccgac	ctggagagca	tgctgcggca	6480
cttcgagcgg	gagcaccacg	acaaggtgcg	cggttggtg	gggttctccg	tgccctggc	6540
gcaccggatc	acggcgggcg	ccgacgcgct	cctcatgcc	tcccggttcg	agccgtgcgg	6600
gctgaaccag	ctctacgcca	tggcctacgg	caccgtcccc	gtcgtgcacg	ccgtcggcgg	6660
gctgagggac	accgtgccgc	cgttcgacct	cttcaaccac	tccggcctcg	ggtggacgtt	6720
cgaccgcgcc	gagcgccaca	agctgatcga	ggcgctcggg	cactgcctcc	gcacctaccg	6780
ggactacaag	gagagctgga	ggggcctcca	ggagcgcggc	atgtcgcagg	acttcagctg	6840
ggagcatgcc	gccaagctct	acgaggacgt	cctcctcaag	gccaaagtaac	agtgggtga	6898

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para detectar la presencia de trigo común en una muestra de interés, cuyo método comprende: llevar a cabo un procedimiento operativo de PCR usando un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO:6, con un ácido nucleico extraído de la muestra de interés que se usa como molde; y detectar la presencia de un producto de amplificación de PCR.
- 2.- Un método para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de trigo común en una muestra de interés, cuyo método comprende: llevar a cabo un procedimiento operativo de PCR cuantitativa usando un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11, con un ácido nucleico extraído de la muestra de interés que se usa como molde.
- 3.- El método para detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia de trigo común según la reivindicación 2, en donde la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11 es una sonda de ácidos nucleicos marcada, cuyo método comprende obtener una curva de amplificación monitorizando durante la PCR una señal que corresponde a la cantidad de un producto de amplificación generado por la sonda de ácidos nucleicos marcada.
- 4.- El método según la reivindicación 2, en donde la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11 es una sonda de ácidos nucleicos marcada, cuyo método comprende obtener una curva de amplificación monitorizando durante la PCR una señal que corresponde a la cantidad de un producto de amplificación generado por la sonda de ácidos nucleicos marcada, y detectar cuantitativamente la presencia de trigo común usando una curva de calibración que ha sido construida por anticipado.
- 5.- Un conjunto de cebadores que comprende un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6.
- 6.- Una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11.
- 7.- La sonda de ácidos nucleicos según la reivindicación 6, que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO:11, modificada por un fluoróforo en su extremo 5'-terminal y modificada por un desactivador de fluorescencia en su extremo 3'-terminal.
- 8.- Un método para detectar la presencia de trigo común y/o un trigo distinto de trigo común existente en una muestra de interés, cuyo método comprende:
- (1) preparar una muestra de ácido nucleico extrayendo un ácido nucleico de la muestra de interés, y
- (a) detectar la presencia de trigo común llevando a cabo un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que utiliza la muestra de ácido nucleico, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11 y obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de un producto de amplificación generado por la sonda de ácidos nucleicos, y
- (b) detectar la presencia de trigo llevando a cabo un procedimiento operativo de PCR cuantitativa que utiliza la muestra de ácido nucleico, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:9, un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:10, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:13 y obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de un producto de amplificación generado por la sonda de ácidos ; y
- (2) comparar los resultados de (a) con los resultados de (b).
- 9.- El método según la reivindicación 8, que comprende:
- (1) en (a), obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de un producto de amplificación generado por la sonda de ácidos nucleicos y detectar cuantitativamente la presencia de trigo común usando una curva de calibración que ha sido construida por anticipado. y
- en (b), obtener una curva de amplificación monitorizando una señal que corresponde a la cantidad de producto de amplificación generado por la sonda de ácidos nucleicos y detectar cuantitativamente la presencia de trigo usando una curva de calibración que ha sido construida por anticipado; y
- (2) comparar el valor cuantitativo de (a) con el valor cuantitativo de (b).
- 10.- El método según la reivindicación 8 ó 9, en donde la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11 y la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:13, son sondas de ácidos nucleicos marcadas.

- 11.-El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11 es una sonda de ácidos nucleicos modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo y modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia, y la sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta por SEQ ID NO:13 es una sonda de ácidos nucleicos modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo y modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia..
- 12.- Un kit de detección de trigo común, que comprende un conjunto de cebadores con un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:5 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:6.
- 10 13.- El kit de detección de trigo común según la reivindicación 12, que comprende, además, una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:11, que está modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo. y que está modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia..
- 15 14.- El kit de detección de trigo común según la reivindicación 13, que comprende, además, un conjunto de cebadores con un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:9 y un cebador que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:10, y una sonda de ácidos nucleicos que consiste en la secuencia de bases expuesta en SEQ ID NO:13 que está modificada en su extremo 5' terminal por un fluoróforo y que está modificada en su extremo 3' terminal por un desactivador de fluorescencia.

FIG.1

LIMITE DE DETECCIÓN DE DNA DE TRIGO COMÚN POR PCR

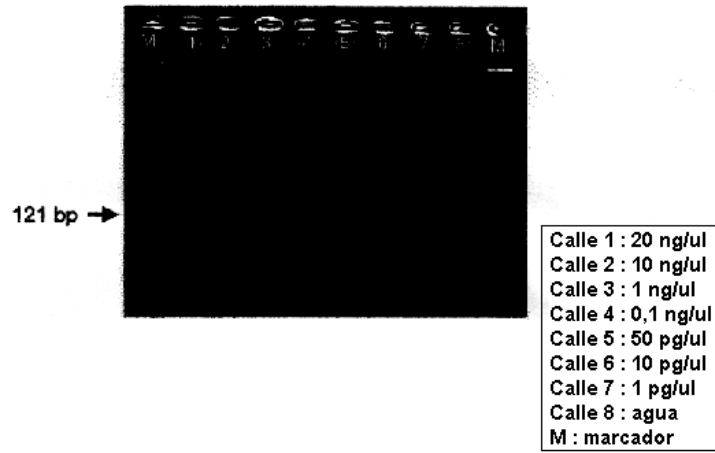


FIG.2

EVALUACIÓN DE PAR DE CEBADORES Y SONDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS
PARA LA DETECCIÓN DE TRIGO COMUN POR PCR CUANTITATIVA
(EJEMPLO DE SERIE DE DILUCIONES DE LA SOLUCIÓN DE DNA

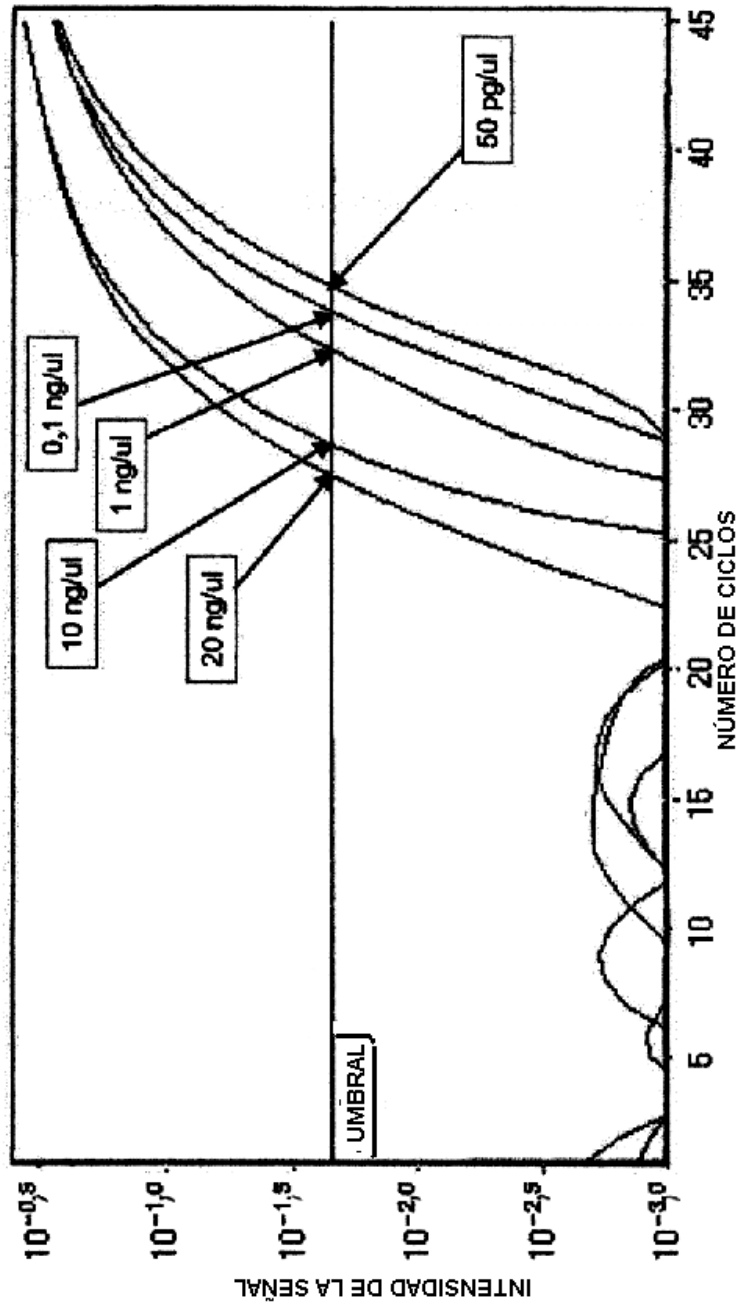


FIG.3

EVALUACIÓN DE PAR DE CEBADORES Y SONDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS
PARA LA DETECCIÓN DE TRIGO COMÚN POR PCR CUANTITATIVA
(CONFIRMACIÓN DE ESPECIFICIDAD)

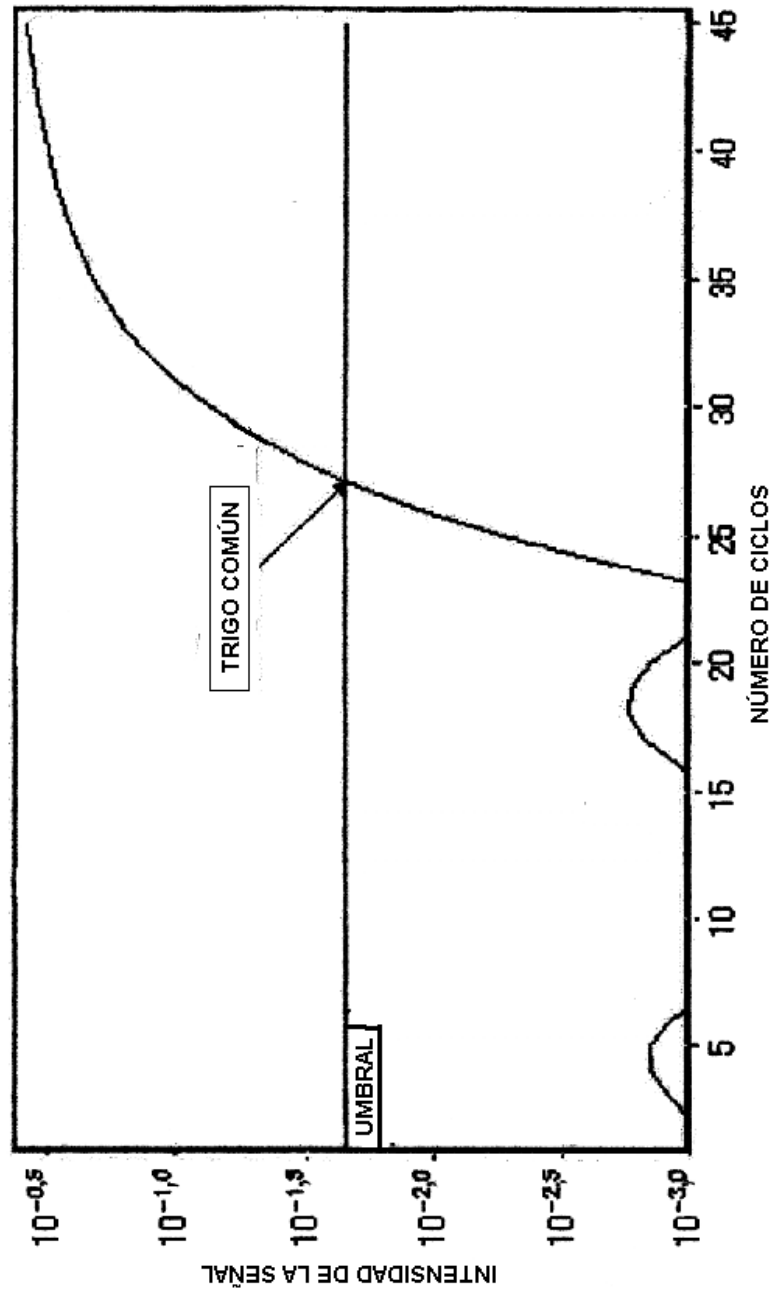


FIG.4

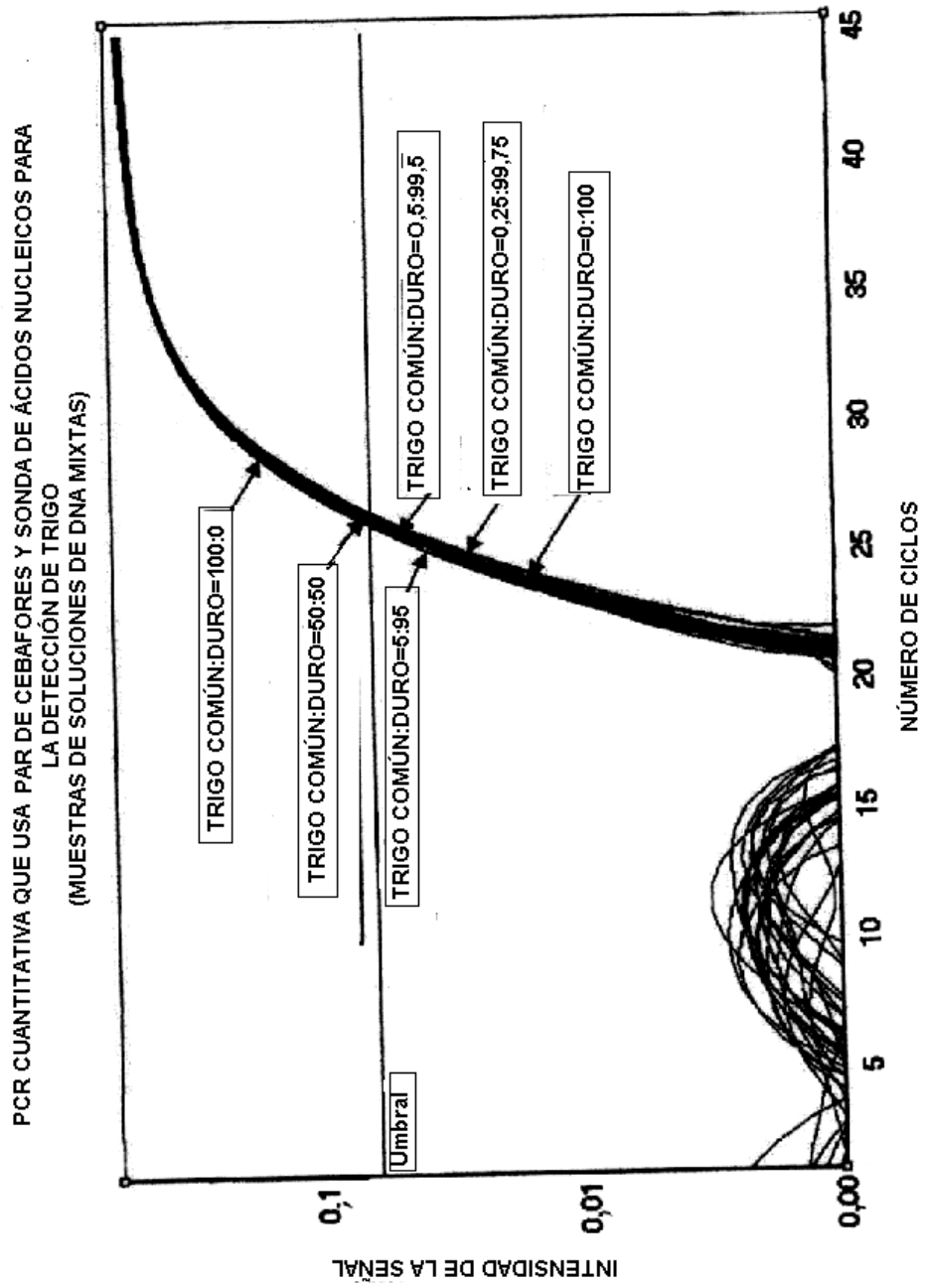


FIG.5

PCR CUANTITATIVA QUE USA PAR DE CEBADORES Y SONDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA
LA DETECCIÓN DE TRIGO
(MUESTRAS DE HARINAS MIXTAS)

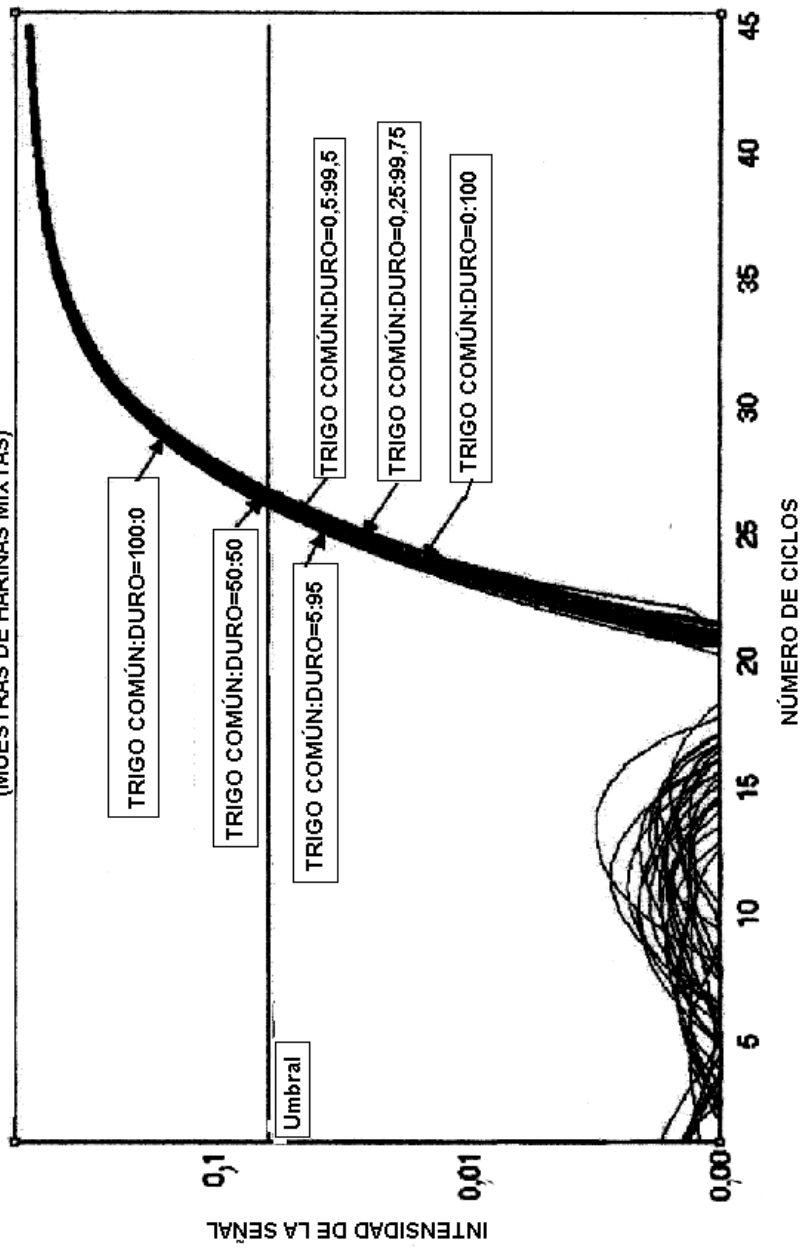


FIG.6

PCR CUANTITATIVA QUE USA PAR DE CEBADORES
Y SONDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA DETECCIÓN DE
TRIGO COMÚN
(MUESTRAS DE SOLUCIONES DE DNA MIXTAS)

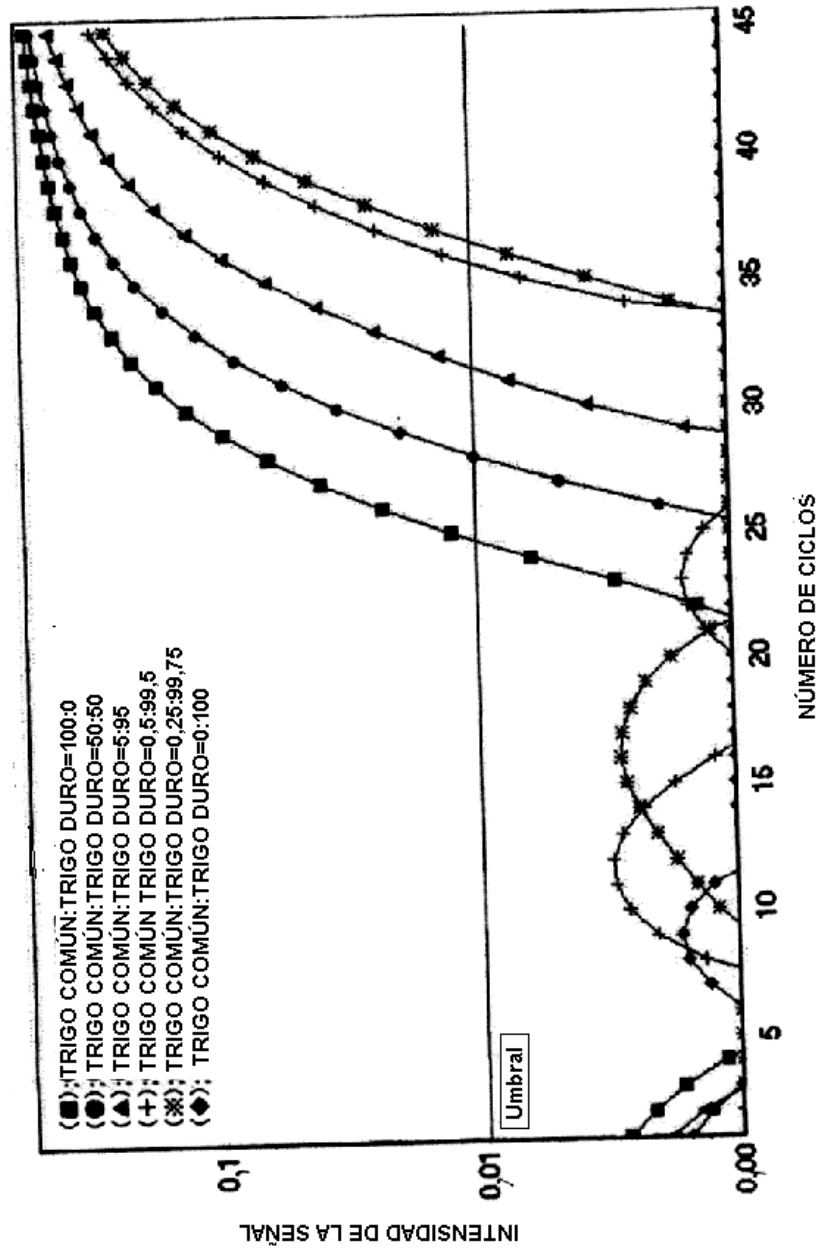


FIG.7

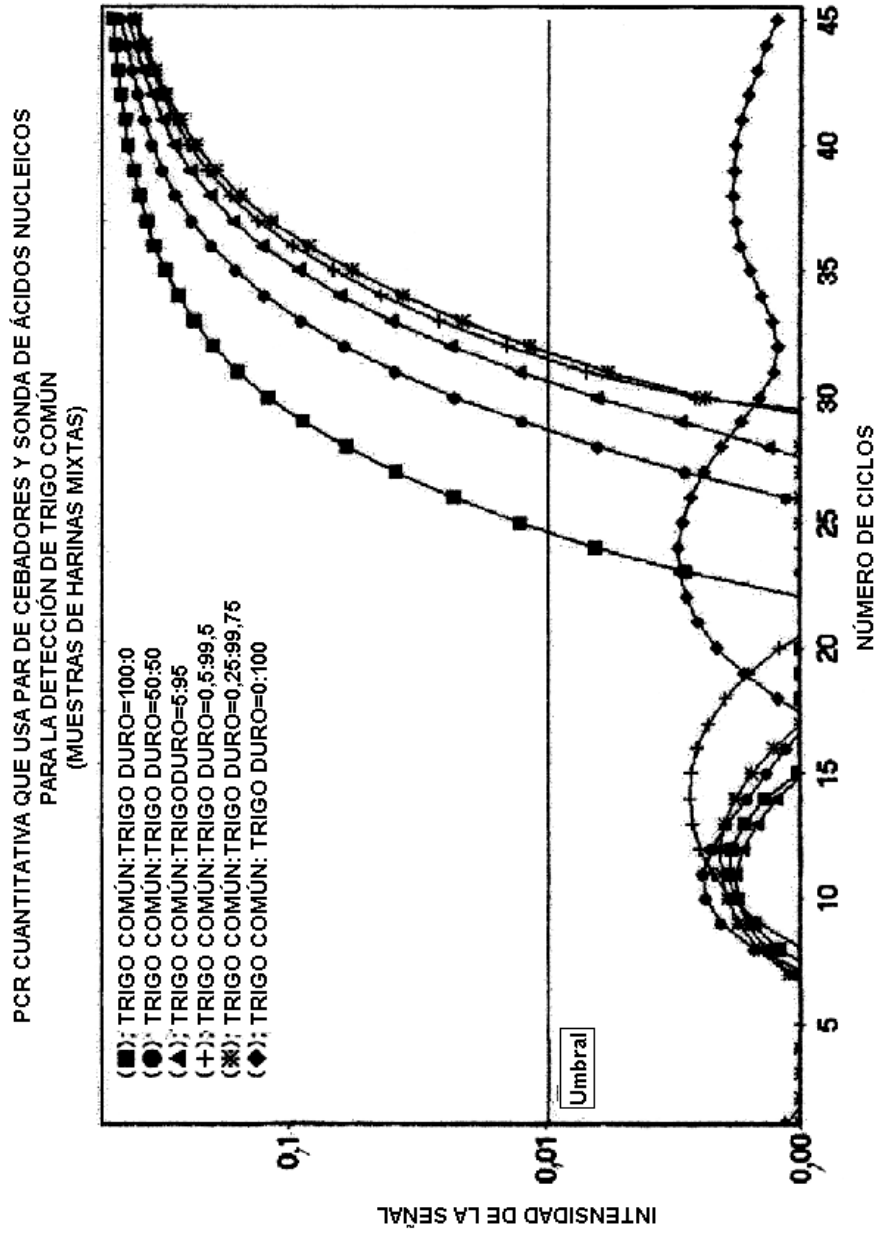


FIG.8

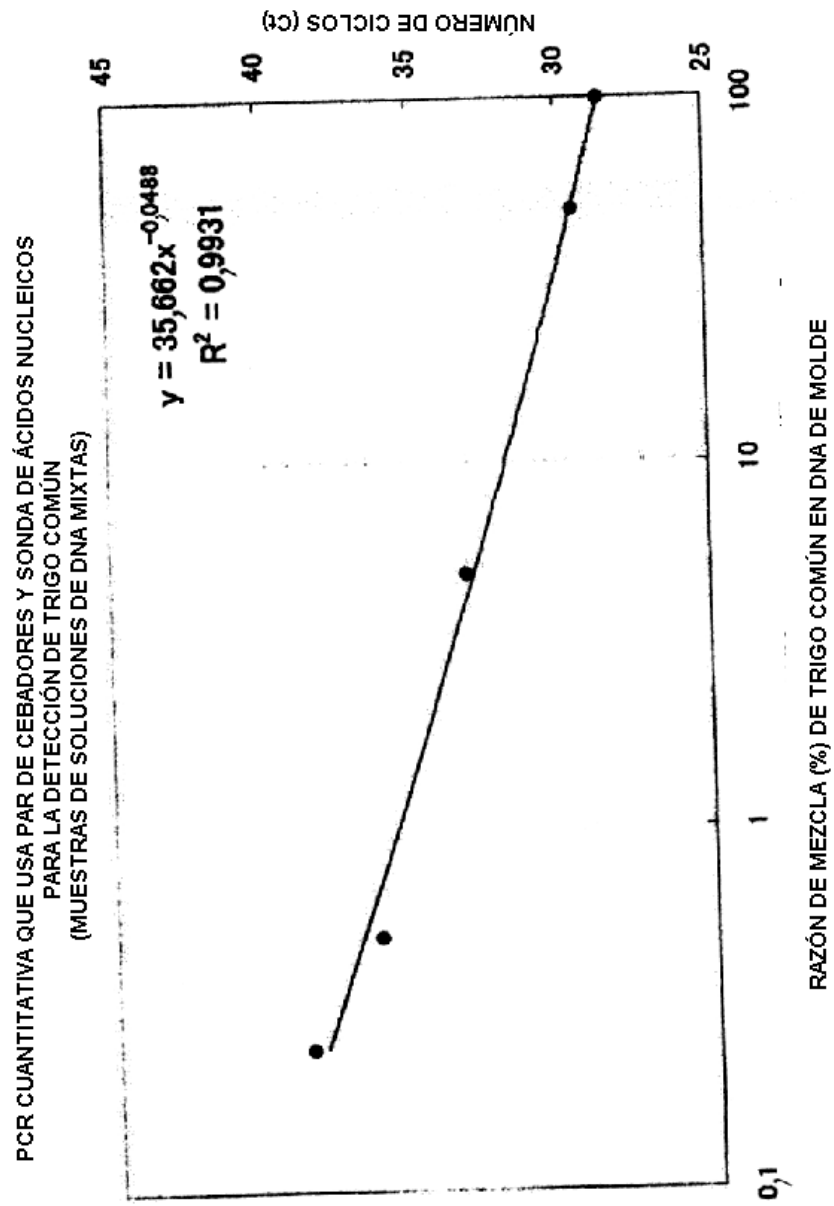


FIG.9

