

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 206**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/46** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012 PCT/FR2012/000213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12160278**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12729672 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2714728**

54 Título: **Cebadores universales y su utilización para la detección y la identificación de especies de batracios/peces**

30 Prioridad:

**26.05.2011 FR 1154608**

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

**11.09.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES (50.0%)  
621 avenue Centrale  
38400 Saint-Martin-d'Hères, FR y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TABERLET, PIERRE;  
COISSAC, ERIC y  
RIAZ, TIAYYBA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 632 206 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

Cebadores universales y su utilización para la detección y la identificación de especies de batracios/peces.

5 La presente invención se refiere a unos oligonucleótidos y a su utilización como cebadores universales para la detección y la identificación de especies de batracios y/o peces, en particular en sustratos complejos y degradados.

10 La identificación taxonómica basada en el análisis del ADN es un enfoque utilizado habitualmente en la actualidad para identificar unas especies dentro de una mezcla. Se ha creado un consorcio internacional denominado Barcode for Life con el objetivo de permitir la detección de especies animales o vegetales a partir de una secuencia de ADN. Para identificar los animales, el enfoque consiste en amplificar y después en secuenciar una secuencia de 648 pares de bases del gen mitocondrial citocromo c oxidasa 1 ("CO1"). CO1 se ha mostrado eficaz para la identificación de los pájaros, mariposas, peces, moscas y otros grupos animales (Hebert *et al.*, 15 2003). Para los vegetales, la situación es más compleja y se han propuesto otras dos secuencias de ADN cloroplásticas, *matK* y *rbcL* (Hollingsworth *et al.*, 2009). Sin embargo, parece que los fragmentos seleccionados según este método son de una longitud demasiado larga (superior a 500 nucleótidos) como para ser utilizados en sustratos degradados. Ahora bien, en numerosas situaciones, los sustratos a analizar contienen ADN degradado, frecuentemente con unos fragmentos de menos de 100 nucleótidos. Es el caso en particular de las muestras 20 recogidas en el medioambiente (suelo, agua, heces) o de las matrices utilizadas en la industria, por ejemplo las harinas animales o los platos industriales de la industria alimentaria.

25 Una solución para la detección y la identificación específica consiste en analizar unos fragmentos de ADN informativos de pequeño tamaño (Poinar *et al.*, 1998; Willersley *et al.*, 2003; Willersley *et al.*, 2007). Se han podido definir así unos cebadores con el fin de amplificar unos fragmentos de ADN vegetales más cortos en muestras de suelos congelados. Sin embargo, los cebadores permiten identificar las familias, pero no las especies vegetales. Además, los cebadores no se seleccionaron con el fin de amplificar unas secuencias suficientemente conservadas en el reino animal como para permitir la amplificación de cualquier especie vegetal. En otras palabras, estos cebadores no son verdaderamente universales.

30 El documento WO 2006/024751 describe un procedimiento que permite detectar simultáneamente en una muestra de materia biológica la presencia eventual de materias biológicas por reacción de polimerización en cadena (PCR) y después hibridación con sondas. Los cebadores descritos están muy degenerados (prácticamente cada codón comprende un nucleótido degenerado) y carecen, por lo tanto, de especificidad para 35 la amplificación del ADN de vertebrados.

40 La patente EP 1 797 201 propone unos oligonucleótidos que permiten la detección y la identificación de vegetales en sustratos complejos o degradados ya que la región amplificada es al mismo tiempo, corta y muy variable. Más precisamente, la región amplificada corresponde a una región variable del intrón del gen cloroplástico *trnL* del tabaco. A este respecto, se hace referencia también al artículo de Taberlet *et al.*, 2007.

Los cebadores descritos en esta patente son específicos de las especies vegetales y no permiten la identificación y la detección de las especies de batracios y/o peces en sustratos complejos o degradados.

45 Takashi *et al.* (2006) describen un método que utiliza unos oligonucleótidos universales para la identificación de especies basada en la PCR. El método descrito permite la amplificación de fragmentos de tamaño que va de 215 a 244 pb y permite identificar diferentes tipos de vertebrados desde el ser humano, el pájaro, los reptiles, los batracios y los peces. La utilización de estos cebadores es inadaptada para la amplificación de fragmentos a partir de ADN degradado.

50 Pereira *et al.* (2006) describen un método que tiene como objetivo la identificación de especies de mamíferos basado en la utilización de diecisiete pares de cebadores para amplificar unos fragmentos de ADN mitocondrial de tipo 12S de un tamaño de menos de 100 pb. Martin *et al.* (2010) describen un método para identificar la presencia de harina de pescado en los alimentos destinados a animales mediante un método de amplificación por PCR de fragmentos de un tamaño de 87 pb a partir del gen del ARN mitocondrial 12S.

60 La presente invención propone nuevos oligonucleótidos y sus utilidades como cebadores universales para la identificación y la detección de las especies de batracios y/o de peces. Estos cebadores permiten al mismo tiempo amplificar una región corta (menos de 95 pares de bases), una región muy variable entre las especies de batracios y/o de peces, y una región que presenta al mismo tiempo unas regiones flanqueantes muy conservadas que permiten la amplificación con la ayuda de un solo y único par de cebadores. Así, estos cebadores pueden ser utilizados en mezclas complejas y degradadas, por ejemplo en muestras de suelos, de heces y de agua. Unos cebadores de este tipo encuentran aplicaciones en particular en el análisis de las comidas preparadas industriales susceptibles de contener unas mezclas de batracios y/o peces, pero también 65 para el análisis de los regímenes alimenticios de los carnívoros a partir de las heces.

Más precisamente, estos cebadores permiten amplificar una región 12S del ADN mitocondrial. Es particularmente interesante disponer de cebadores que permiten la amplificación de ADN mitocondrial ya que éste representa una diana muy accesible en el caso de sustratos degradados. Además, el ADN mitocondrial está presente de manera repetida en cada célula.

5

Los cebadores universales, objeto de la presente invención, son particularmente ventajosos ya que son extremadamente específicos de los batracios y/o peces y no amplifican ningún otro grupo taxonómico.

### Descripción de la invención

10

La invención se refiere a un par de oligonucleótidos, según el cual el primer oligonucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 4 y el segundo nucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 5 o a la secuencia SEC ID nº 6 en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de los batracios y peces por reacción de polimerización en cadena (PCR).

15

Según un aspecto de la invención, la región amplificada del gen mitocondrial 12S comprende menos de 95 nucleótidos.

20

Según otro aspecto de la invención, el primer oligonucleótido presenta una secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 y el segundo oligonucleótido presenta una secuencia nucleotídica SEC ID nº 2 o SEC ID nº 3.

Según otro aspecto de la invención, la región amplificada por reacción de polimerización en cadena presenta una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID nº<sup>os</sup> 14-48.

25

La presente invención propone también una mezcla de cebadores para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de batracios y peces por reacción de polimerización en cadena (PCR) que comprende los cebadores de amplificación según las SEC D nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3.

30

Según un aspecto de la invención, la mezcla de cebadores comprende además un cebador de bloqueo según la SEC ID nº 7.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de amplificación de una región del gen mitocondrial 12S de las especies de batracios y de peces, que comprende las etapas siguientes:

35

- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de una especie de batracio y/o pez;
- b) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según la invención o una mezcla de cebadores según la invención.

40

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección de una especie de batracio y/o de pez en una muestra, que comprende las etapas siguientes:

- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de una especie de batracio y/o de pez;
- b) se aísla el ADN total contenido en la muestra;
- c) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según la invención o una mezcla de cebadores según la invención; y
- d) se detecta la eventual presencia de un producto de amplificación.

50

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección y de identificación de una especie de batracio y/o de pez en una muestra, que comprende las etapas siguientes:

55

- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de una especie de batracio y/o de pez;
- b) se aísla el ADN contenido en la muestra;
- c) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según la invención o una mezcla de cebadores según la invención;
- d) se detecta la presencia de un producto de amplificación; y

60

- e) se determina la secuencia del producto de amplificación para identificar la especie de batracio y/o de pez contenida en la muestra.

65

La presente invención propone también un kit para la detección de una especie de batracio y/o de pez en una muestra que comprende un par de oligonucleótidos según la invención o una mezcla de cebadores según la invención y por lo menos un reactivo adicional.

5 Según un aspecto de la invención, el kit comprende otro par de oligonucleótidos seleccionados de entre los pares de cebadores:

- 10 - cebadores de amplificación según las SEC ID nº 8 y SEC ID nº 9, eventualmente con cebador de bloqueo según la SEC ID nº 10; y
- cebadores de amplificación según las SEC ID nº 11 y SEC ID nº 12, eventualmente con cebador de bloqueo según la SEC ID nº 13.

15 **Descripción del listado de secuencias**

SEC ID nº 1: cebador BT\_F

20 SEC ID nº 2: cebador B\_R

SEC ID nº 3: cebador T\_R

SEC ID nº 4: secuencia de la región complementaria del cebador BT\_F

25 SEC ID nº 5: secuencia de la región complementaria del cebador B\_R

SEC ID nº 6: secuencia de la región complementaria del cebador T\_R

30 SEC ID nº 8-9 y 11-12: par de cebadores de amplificación adicionales que pueden ser añadidos al kit de detección según la invención

SEC ID nº 7, 10 y 13: cebadores de bloqueo

35 SEC ID nº 14-48: ejemplos de secuencias variables amplificadas de diferentes especies de batracios y de peces

SEC ID nº 49-50: variantes del cebador BT\_F

40 SEC ID nº 51-52: variantes del cebador B\_R

Par de oligonucleótidos

La presente invención se refiere por lo tanto a unos oligonucleótidos derivados de dos regiones conservadas de un gen 12S mitocondrial presente en los batracios y peces. Estos oligonucleótidos se pueden utilizar como cebadores para la amplificación y por lo tanto la detección del ADN de batracios y peces en una muestra susceptible de contener dicho ADN. En efecto, las regiones conservadas de las cuales se derivan los polinucleótidos de la presente invención flanquean una región al mismo tiempo corta y muy variable del ADN de los batracios y peces, más precisamente una región corta y variable en el gen 12S mitocondrial de los batracios y peces. La variabilidad de esta región entre especies de batracios y peces puede ser por lo tanto utilizada para detectar e identificar las especies de batracios y peces.

Según la presente invención, se entiende por "oligonucleótido" una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementario que puede ser de tipo ADN o ARN, o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN complementario o genómico. Según un modo de realización, los oligonucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular ADN bicatenario. El término "oligonucleótido" designa también los polinucleótidos modificados. Los oligonucleótidos modificados son por ejemplo unos oligonucleótidos conjugados con unos reactivos de unión (biotina por ejemplo) o con unos reactivos marcados (marcadores fluorescentes por ejemplo). Clásicamente, los reactivos de unión o los reactivos marcados conjugados con los oligonucleótidos facilitan la purificación o la detección de estos oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden ser preparados por síntesis química o mediante técnicas clásicas de biología molecular tales como las descritas por Sambrook Fritsch y Maniatis, en su trabajo titulado "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden también ser aislados o purificados de su entorno natural.

El término "polinucleótido" se puede utilizar en la presente memoria en sustitución del término "oligonucleótido" con un significado equivalente.

5 Se entiende por "cebador" una corta secuencia de oligonucleótidos que, hibridada con una matriz de ácido nucleico, permite que una polimerasa inicie la síntesis de una nueva hebra del ADN. La hebra producida a partir del cebador es complementaria de la hebra utilizada como matriz. Los cebadores se utilizan en particular en las reacciones de polimerización en cadena (PCR).

10 Se entiende por "especie de batracio" o "especie de pez" cualquier organismo que pertenece respectivamente al reino de los batracios o al reino de los peces.

15 La presente invención se refiere por lo tanto a un par de oligonucleótidos según el cual el primer oligonucleótido se hibrida de manera selectiva a una región muy conservada del gen mitocondrial 12S de los batracios y peces y el segundo nucleótido se hibrida de manera selectiva a otra región muy conservada del gen mitocondrial 12S de los batracios o a otra región muy conservada del gen mitocondrial 12S de los peces en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación de la región variable del gen mitocondrial 12S de los batracios y peces por reacción de polimerización en cadena (PCR), por ejemplo en unas condiciones de fuerte astringencia. La secuencia de la primera región conservada corresponde a la secuencia del cebador BT\_F (SEC ID nº 1) y de su secuencia complementaria (SEC ID nº 4). La secuencia de la segunda región conservada corresponde a la secuencia del cebador B\_R (SEC ID nº 2) y de su secuencia complementaria (SEC ID nº 5). Alternativamente, la secuencia de la segunda región conservada corresponde a la secuencia del cebador T\_R (SEC ID nº 3) y de su secuencia complementaria (SEC ID nº 6).

25 A título de ejemplo, en *Rana nigromaculata*, el primer oligonucleótido de la presente invención se encuentra en la posición 3525 a 3541 de la secuencia NC\_002805, y el segundo oligonucleótido de la invención se encuentra en la posición 3596 a 3618 de esta misma secuencia. En *Gadus morhua*, el primer oligonucleótido de la presente invención se encuentra en la posición 904 a 920 de la secuencia NC\_002081, y el segundo oligonucleótido de la invención se encuentra en la posición 983 a 1002 de esta misma secuencia.

30 El experto en la materia conoce las reacciones de amplificación de ADN y las condiciones de astringencia que permiten una amplificación selectiva de una secuencia. El experto en la materia conoce en particular las condiciones de temperatura de hibridación y las condiciones de composición del tampón de hibridación.

35 El experto en la materia podrá por lo tanto definir fácilmente diferentes variantes de los cebadores BT\_F (SEC ID nº 1) y B\_R (SEC ID nº 2) o T\_R (SEC ID nº 3) utilizando unas técnicas de rutina. Estas variantes se hibridan a las secuencias de referencia y permiten la amplificación selectiva de la región variable de interés del ADN mitocondrial 12S.

40 Dos variantes posibles del cebador BT\_F (SEC ID nº 1) están representadas en las secuencias SEC ID nºs 49-50. Dos variantes posibles del cebador B\_R (SEC ID nº 2) están representadas en las secuencias SEC ID nºs 51-52. Habitualmente, las variaciones de secuencia son más bien introducidas en el extremo 5' de los oligonucleótidos para no comprometer la reacción de amplificación. Clásicamente, se pueden introducir por ejemplo unos nucleótidos suplementarios en el extremo 5' de los oligonucleótidos.

45 Por "secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva" u "oligonucleótido capaz de hibridarse de manera selectiva" se entiende, según la invención, las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces más intenso que el de la interacción de las demás secuencias de ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son conocidas por el experto en la materia. En general, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior en por lo menos 5°C, por ejemplo 10°C, a la T<sub>m</sub> de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30°C para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60°C para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los lavados se realizan, por ejemplo, sucesivamente a baja astringencia, en un tampón 2X SSC, 0,1% de SDS, a media astringencia en un tampón 0,5X SSC, 0,1% SDS y a alta astringencia en un tampón 0,1X SSC, 0,1% SDS. La hibridación se puede efectuar por supuesto según otros métodos habituales conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook, Fritsch y Maniatis, en su trabajo titulado "Molecular cloning: a laboratory manual", edición: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

60 Por "astringencia" se entiende la astringencia de las condiciones de realización (en particular la temperatura y la fuerza iónica) en las que se desarrolla una hibridación molecular.

65 El parámetro determinante en la especificidad y la reversibilidad de la hibridación molecular es la T<sub>m</sub> o

- temperatura de fusión (melting temperature). Es la temperatura a la que la mitad del ADN está en forma monocatenaria y la otra mitad en forma bicatenaria. La  $T_m$  depende de numerosos factores tales como la longitud del fragmento de ADN considerado, su riqueza en citosinas y guaninas y la concentración en sales, en particular en ion Na del medio de reacción. En la práctica, el experimentador puede crear o suprimir la hibridación molecular seleccionando una temperatura del medio de reacción inferior, igual o superior a la  $T_m$ . Las condiciones de alta astringencia son aquellas para las cuales la temperatura de hibridación y de lavado es inferior a por lo menos 5°C y hasta por lo menos 10°C en  $T_m$  de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada.
- Por "amplificación" se entiende cualquier amplificación enzimática *in vitro* de una secuencia definida de ADN, en particular de tipo reacción de polimerización en cadena (o Polymerase Chain Reaction, PCR).
- Los cebadores según la invención pueden comprender además unas etiquetas que permitirán identificar rápidamente la pertenencia de cada secuencia amplificada a una muestra de partida. El término "cola" se puede utilizar de manera equivalente, en lugar del término "etiqueta" ("tags" en inglés). Las etiquetas son secuencias nucleotídicas cortas, generalmente de longitud inferior a 10 nucleótidos. Estas etiquetas son particularmente útiles cuando se trata de utilizar unos secuenciadores de nueva generación que permiten secuenciar cerca de 100000 secuencias al mismo tiempo. En efecto, cada etiqueta corresponde a una muestra de partida a analizar, se puede así mezclar varios productos de amplificación antes de proceder a la secuenciación. Esto es ventajoso ya que utilizar una secuenciación mediante un secuenciador de nueva generación puede ser una operación costosa. En la práctica, los cebadores según la invención pueden comprender un fragmento nucleotídico adicional en el lado 5' específico de cada muestra. Después de la amplificación de varias muestras, de la mezcla de los diferentes productos de amplificación así obtenidos, y de la secuenciación, cada secuencia amplificada es así fácilmente asignada a una muestra de partida. Las etiquetas constituyen por lo tanto una herramienta particularmente ventajosa cuando se trata de secuenciar a alto caudal (Binladen *et al.*, 2007).
- Habitualmente, la amplificación comprende unos ciclos sucesivos (generalmente de 20 a 40) de amplificación, compuestos a su vez por tres fases: después de una etapa de desnaturalización (separación de las dos hebras de la doble hélice) del ADN, el posicionamiento de los cebadores (cortas secuencias de oligonucleótidos específicamente seleccionadas) frente a sus secuencias complementarias, sobre las hebras de ADN, y su fijación sobre estas dianas constituye la segunda fase del procedimiento (hibridación). La fase de extensión hace intervenir una enzima, la ADN polimerasa, que sintetiza, a partir de los cebadores, la hebra complementaria de la que ha servido de matriz. La repetición de este ciclo conduce a la amplificación exponencial del fragmento de ADN, también denominado producto de amplificación o ADN amplificado. Según un aspecto de la invención, la hibridación se efectúa a una temperatura comprendida entre 45 y 65°C. En particular, la hibridación se puede efectuar a una temperatura comprendida entre 45 y 60°C cuando los cebadores no comprenden ninguna etiqueta. Alternativamente, la hibridación se puede efectuar a una temperatura comprendida entre 50 y 65°C cuando los cebadores comprenden una etiqueta.
- Según otro aspecto, la invención se refiere a un par de oligonucleótidos, según el cual el primer oligonucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 4 y el segundo nucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 5 en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de *Rana nigromaculata* cuya secuencia está representada en la SEC ID nº 29 y que puede ser utilizada como secuencia de referencia de batracio.
- Según otro aspecto, la invención se refiere a un par de oligonucleótidos, según el cual el primer oligonucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 4 y el segundo nucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 6 en unas condiciones de astringencia suficientes para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de *Gadus morhua* cuya secuencia está representada en la SEC ID nº 39 y que puede ser utilizada como secuencia de referencia de peces.
- Según un aspecto de la invención, el par de oligonucleótidos permite la amplificación de una región del gen mitocondrial 12S que comprende menos de 95 nucleótidos, en particular menos de 90 o menos de 80 nucleótidos, cebadores no incluidos (es decir, sin contar la longitud de los cebadores). Disponer de un par cebador universal que permite la amplificación de una región variable corta es muy ventajoso ya que la utilización de dichos cebadores en unos sustratos complejos o degradados permite la detección y, si fuese necesario, la identificación de las especies en dichos sustratos.
- Los cebadores de la presente invención permiten detectar e identificar más de 4012 especies de batracios y peces. Las tablas 1 y 2 representan una parte de las secuencias susceptibles de ser amplificadas con los cebadores de la presente invención. Según un aspecto de la presente invención, la región amplificada por reacción de polimerización en cadena presenta una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo constituido por cualquiera de las SEC ID nºs 14-48.
- La presente invención se refiere asimismo a una mezcla de cebadores para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de los vertebrados por reacción de polimerización en cadena (PCR) que

comprende los cebadores de amplificación BT\_F (SEC ID nº 1), B\_R (SEC ID nº 2) y T\_R (SEC ID nº 3) según un aspecto de la invención, la mezcla comprende además un cebador de bloqueo según la SEC ID nº 7. Alternativamente, la invención se refiere también a una mezcla de cebadores para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de los vertebrados por reacción de polimerización en cadena (PCR) que comprende los cebadores de amplificación BT\_F y B\_R o T\_R y por lo menos otro par de oligonucleótidos seleccionados de entre los pares de cebadores:

- cebadores de amplificación según las SEC ID nº 8 y SEC ID nº 9, eventualmente con cebador de bloqueo según la SEC ID nº 10; y
- cebadores de amplificación según las SEC ID nº 11 y SEC ID nº 12, eventualmente con cebador de bloqueo según la SEC ID nº 13.

Procedimientos que utilizan el par de oligonucleótidos

La presente invención se refiere también a un procedimiento de amplificación de una región del gen mitocondrial 12S de los batracios/peces, que comprende las etapas siguientes:

- a) se dispone de una muestra que contiene ADN de batracios/peces;
- b) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según la invención.

La muestra a partir de la cual se realiza la reacción de amplificación puede ser recogida en el medioambiente. En tal caso, puede tratarse, por ejemplo, de una muestra de suelo, agua o heces. La muestra puede también provenir de la industria, por ejemplo de comidas preparadas industriales (alimentos transformados) de la industria alimentaria. La muestra en cuestión puede provenir por ejemplo de un producto que se ha congelado, liofilizado o calentado. Una ventaja del procedimiento según la invención, utilizando los cebadores descritos anteriormente es que el ADN contenido en la muestra se puede encontrar en forma degradada. Esto se debe principalmente al hecho de que los cebadores se han seleccionado de manera que la región amplificada sea corta, por ejemplo de longitud inferior a 95 pares de bases.

Según un aspecto de la invención, la hibridación se efectúa a una temperatura comprendida entre 45 y 65°C. En función del hecho de que los pares de oligonucleótidos de la invención comprenden o no una etiqueta tal como se ha descrito anteriormente, las condiciones de la amplificación, en particular la temperatura de hibridación, puede variar o no. En particular, la hibridación se puede efectuar a una temperatura comprendida entre 45 y 60°C cuando los cebadores no comprenden ninguna etiqueta. Por ejemplo, se puede utilizar una temperatura de 51-53°C. Alternativamente, la hibridación se puede efectuar a una temperatura comprendida entre 50 y 65°C cuando los cebadores comprenden una etiqueta. Por ejemplo, se puede utilizar una temperatura de 57-58°C. El experto en la materia sabe adaptar la temperatura de hibridación a los cebadores utilizados.

El procedimiento de amplificación según la invención puede necesitar una etapa de extracción del ADN antes de efectuar la amplificación. Se utiliza entonces por ejemplo para ello un kit de extracción disponible en el comercio.

La presente invención propone asimismo un procedimiento de detección de una especie de batracios/peces en una muestra. Este procedimiento de detección según la invención comprende las etapas siguientes:

- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de especies de batracios/peces;
- b) se aísla el ADN total contenido en la muestra;
- c) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según la invención; y
- d) se detecta la eventual presencia de un producto de amplificación.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección y de identificación de una especie de batracios/peces en una muestra, que comprende las etapas siguientes:

- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de especies de batracios/peces;
- b) se aísla el ADN total contenido en la muestra;
- c) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según la invención;

- d) se detecta la presencia de un producto de amplificación; y
- e) se determina la secuencia del producto de amplificación para identificar la especie batracios/peces contenida en la muestra.

5 La etapa de determinación de la secuencia corresponde a la secuenciación de ésta. Los métodos y herramientas de secuenciación son conocidos por el experto en la materia y un ejemplo de lo que se puede utilizar en la presente invención se proporciona en la parte experimental.

10 Kit de detección

La invención se refiere asimismo a un kit para la detección de una especie batracios/peces en una muestra, comprendiendo dicho kit un par de oligonucleótidos según la invención.

15 Según un aspecto de la invención, el kit comprende además un cebador de bloqueo según la SEC ID nº 7. Utilizar un cebador de bloqueo es útil cuando se trata de evitar la amplificación de una especie determinada, por ejemplo el ser humano o la vaca. Estos cebadores se seleccionan a partir del extremo más variable del fragmento amplificado, y de manera que el cebador de bloqueo se solape con el cebador de amplificación sobre por lo menos 6 nucleótidos, por ejemplo sobre 8 nucleótidos. Finalmente, es necesario que la Tm del cebador de  
20 bloqueo sea claramente superior a la de los cebadores de amplificación (por lo menos 5°C, por ejemplo 10°C).

Según otro aspecto también de la invención, el kit comprende por lo menos otro par de oligonucleótidos. Este por lo menos otro par de oligonucleótidos se puede utilizar entonces a título de verificación del contenido de la muestra o a título de alternativas, por ejemplo si el par de oligonucleótidos BT\_F (SEC ID nº 1) y B\_R (SEC ID nº  
25 2) o B\_R (SEC ID nº 3) no permitiera la amplificación.

Según otro aspecto también de la invención, el kit comprende además una etiqueta de menos de 10 nucleótidos para la identificación de la muestra de partida después de la secuenciación del producto PCR.

30 El kit según la invención puede también contener además de manera no limitativa unos reactivos adicionales, por ejemplo una enzima ADN polimerasa, unos dNTP, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> o "Bovine Serum Albumin (BSA)".

**Ejemplos**

35 **Ejemplo 1: Validación por PCR electrónica con la ayuda del programa ecoPCR (Ficetola *et al.* 2010) de los cebadores BT\_F y B\_R.**

Este experimento se ha llevado a cabo con la versión 107 de EMBL, tolerando un número máximo de tres  
40 desapareamientos por cebador.

Resultados: el número total de secuencias de batracios amplificadas es de 5501, de las cuales 2837 son secuencias únicas que corresponden a 2106 especies y 357 géneros.

45 La longitud del fragmento amplificado (sin los cebadores) varía entre 16 y 71 pares de bases, con una media de 50,6 pares de bases.

El número medio de desapareamientos es de 0,16 para el cebador BT\_F y de 0,48 para el cebador B\_R.

50 Discusión: dado que el número de secuencias únicas es claramente más elevado que el número de especie, esto indica que la resolución de esta región permite en la gran mayoría de los casos una identificación a nivel de la especie.

55 **Ejemplo 2: Validación por PCR electrónica con la ayuda del programa ecoPCR (Ficetola *et al.*, 2010) de los cebadores BT\_F y T\_R.**

Este experimento se ha llevado a cabo con la versión 107 de EMBL, tolerando un número máximo de tres  
60 desapareamientos por cebador.

Resultados: el número total de secuencia de teleósteos amplificadas es de 2742, de las cuales 1929 son secuencias únicas que corresponden a 1906 especies y 357 géneros.

La longitud del fragmento amplificado (sin los cebadores) varía entre 48 y 91 pares de bases, con una media de  
65 63,4 pares de bases.

El número medio de desapareamientos es de 0,21 para el cebador BT\_F y de 0,35 para el cebador T\_R.

Discusión: dado que el número de secuencias únicas es ligeramente más elevado que el número de especie, esto indica que la resolución de esta región permite en la mayoría de los casos una identificación a nivel de la especie.

Tabla 1. Batracios

Tabla elaborada a partir de la versión 107 de la base de datos EMBL

Nombre científico	Número de acceso	Secuencia que corresponde a BT_F	Secuencia amplificada	Secuencia que corresponde a B_R
<i>Allobates brunneus</i>	DQ502047	ACACCGCCCGTCACCCCT	CCTCTTACTAATAAATAAGTTTTTAACCAATTCAGCCRAATCAGAA GAGGT (SEQ ID NO. 14)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Alytes obstetricans</i>	AY364340	ACACCGCCCGTCACCCCT	CCTCAACTAAGTCAACCCCTAATTAARAACAACTAACAGTTAACAG AAGAGGC (SEQ ID NO. 15)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Bombina bombina</i>	AY458591	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAACTAAACCCACACAATTTTTTAATACACAAAATAAAGTAAAG AAGAGGT (SEQ ID NO. 16)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Bombina variegata</i>	AY971143	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAACTAGAACIGATATAATTTCTAAACATAAACGAGTACAAG AAGAGGT (SEQ ID NO. 17)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Bufo bufo</i>	AY325988	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAAGCTACTAACCTAGTTTCTAACAACTAAAGCATACAGA AGAGGC (SEQ ID NO. 18)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Bufo calamita</i>	EU938400	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAAGGCACTGACATAGTTTTTAACCTAACCTAAGCAAAAACAGAA GAGGC (SEQ ID NO. 19)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Bufo viridis</i>	AY680267	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAAGCATAAACAAGTTTTTAACAAGTTTGAGCATACAGAA GAGGC (SEQ ID NO. 20)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Dendrobates auratus</i>	AY326030	ACACCGCCCGTCACCCCT	CCTCAAGCTATTTTAAAGTTTCTTACACATTTTAGCTGCATAGAA GAGGC (SEQ ID NO. 21)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Dendrobates tinctorius</i>	DQ502248	ACACCGCCCGTCACCCCT	CCTCAAGCTACTTTAAAGTTTCTCACAATACCTTAGCTACATAGAA GAGGC (SEQ ID NO. 22)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Discoglossus pictus</i>	AY364342	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAACCCCGCTATTCAGTATTTAATAATTTTGGCRAAAG AAGAGGC (SEQ ID NO. 23)	GTATACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Hyla arborea</i>	AY843601	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAAGCCCGGTATTAGTAAATTAACCTTAACTTAGCAAAATCAGAA GAGGC (SEQ ID NO. 24)	GTACGCTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Hyla meridionalis</i>	AY819370	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAAGCCCTAACAATCAGTAAATTAACCTCAAACTAGCACACCAGA AGAGGC (SEQ ID NO. 25)	GTACGCTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Plethodon cinereus</i>	AY728232	ACACCGCCCGTCACCCCT	CATCAATATATTACTTTAGAGAGGA (SEQ ID NO. 26)	GTAGGCTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Pleurodeles poireti</i>	EU880329	ACACCGCCCGTCACCCCT	CTTCAACAATATAAACCCTATATAAACAGAAATAAAGAAAGA AGAGGC (SEQ ID NO. 27)	GTACGCTTACCAATGTTACGAC TT

Nombre científico	Número de acceso	Secuencia que corresponde a BT_F	Secuencia amplificada	Secuencia que corresponde a B_R
<i>Rana catesbeiana</i>	AY779206	ACACCGCCCGTCACCCT	CTTCGATAGTATCTCACCCTCCCTACCCACTATTACATTTTAG AAGAGGC (SEQ ID NO. 28)	GTACACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Rana nigromaculata</i>	NC_002805		CTTCGATAGCACTTCACCAGGTATTAAACCAATACCGCACTTA GAAGAGGC (SEQ ID NO. 29)	
<i>Rana pipiens</i>	AY779221	ACACCGCCCGTCACCCT	CTTCGATAGTAAATAATTTGTCCTAACCCATTAACACGGTTTAG AAGAGGC (SEQ ID NO. 30)	GTACACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Rana temporaria</i>	AF249023	ACACCGCCCGTCACCCT	CTTCAATAGTACCCCGTATGTTCCCTACCCACACCACGGTTTTAGA AGAGGC (SEQ ID NO. 31)	GTACACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Salamandra salamandra</i>	DQ283440	ACACCGCCCGTCACCCT	CTTCAAAATATTTAAAAAATCTTAAATAAATAAAGTCAGTAAGTA AGAAGAGGC (SEQ ID NO. 32)	GTACACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Triturus cristatus</i>	DQ283441	ACACCGCCCGTCACCCT	CTTCAGAGACTATTAGATAATTAATAAACAAGAAAGAAAAAAGAG AAGAGGC (SEQ ID NO. 33)	GTAAACTTACCAATGTTACGAC TT
<i>Triturus marmoratus</i>	EU880337	ACACCGCCCGTCACCCT	CTTCAAGCACATTTTATATTAATAAACAAGAAAGAAAAAAGAG AGAGGC (SEQ ID NO. 34)	GTAAACTTACCAATGTTACGAC TT

Tabla 2. Peces teleósteos

Tabla elaborada a partir de la versión 107 de la base de datos EMBL

Nombre científico	Número de acceso	Secuencia que corresponde a BT_F	Secuencia amplificada	Secuencia que corresponde a T_R
<i>Anguilla anguilla</i>	AB021887	ACACCGCCCGTCACTCT	CCTCGAATAACAAATAAGACATTTCTATTAACATTAAGACAAAA GAGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 35)	CTCCCGGTACACTTACCGTG
<i>Barbus barbus</i>	AB238965	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCGTCAAAATGCACCAAAATACCTAATGCAACAGCAGCCTGACAAG GGAGCCAAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 36)	CTCCCGGTACACTTACCATG
<i>Clupea harengus</i>	AP009133	ATACCGCCCGTCACTCT	CCCAGGACCACCCAAAAAGGTAAATRAGCGCAATTAATAACAGCA AGGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 37)	CTCCCGGTACTTACCATG
<i>Exocoetus volitans</i>	AP002933	ACACCGCCCGTCACCCT	CCCCAAAACCCCAAAAAGATTAAGTAAACCAATAGATCAATAAAA GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 38)	CTCCCGGTACACTTACCATG
<i>Gadus morhua</i>	AM489716	ACACCGCCCGTCACTCT	CTCCAAATAAACCCCTAGATATTACCTAAAAATGCTTTTATAATAAG GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 39)	CTCCCGGTACCGTTACCATG
<i>Hippocampus coronatus</i>	AB032030	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCTAAAACACACTTAAACTTAAACCAAAATATAATAACRAGG GGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 40)	CTCCCGGTACCGTTACCATG

Nombre científico	Número de acceso	Secuencia que corresponde a BT_F	Secuencia amplificada	Secuencia que corresponde a T_R
<i>Labrus merula</i>	AJ810141	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCGAGTTACGATCTTATAATACCTTAATGCCCTTATAATGCAAG GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 41)	CTCCGGGTACACTTACCATG
<i>Lota lota</i>	AP004412	ACACCGCCCGTCACTCT	CTCCAATAGACCCCTAATAATTTACCTAAAATGTTTTATATAATAG GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 42)	CTCCGGGTACGGCTTACCATG
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AF113120	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCAGTTCAACCTGTCCCTTAACCTAAGAAGTTAACCGAACA GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 43)	CTCCGGGTACACTTACCATG
<i>Salmo trutta</i>	AM910409	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCGAGTCAATTAATCCCTTAACCTAAGAAGTTAACCGAACA GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 44)	CTCCGGGTACACTTACCATG
<i>Salvelinus alpinus</i>	AF154851	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCAGTTTAAATTTATCCCTTAACCTAAGAAGTTAACCGAACA GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 45)	CTCCGGGTACACTTACCATG
<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF154850	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCAGTTTAAATTTATCCCTTAACCTAAGAAGTTAACCGAACA GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 46)	CTCCGGGTACACTTACCATG
<i>Sardina pilchardus</i>	AP009233	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCNACACTACTATATAAATGTAACCTACACAAATATTCGCCG AAGGGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 47)	CTCCGGGTACACTTACCATG
<i>Zeus faber</i>	AP002941	ACACCGCCCGTCACTCT	CCCTGTGGCCCAACCTTTCATAAAACCTTATAAACAAGG GGGAGGCAAGTCGTAA (SEQ ID NO. 48)	CTCCGGGTACGGCTTACCATG

**Listado de secuencias**

	<110> UNIVERSITE JOSEPH FOURIER (GRENOBLE 1) CNRS	
5	<120> Cebadores universales y su utilización para la detección y la identificación de especies de batracios/peces	
	<130> BR075260/NJO/CCU	
	<160> 52	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 17	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 1	
	acaccgcccg tcacyct	17
25	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 2	
35	gtayacttac catgttacga ctt	23
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 3	
	ctccggtac acttaccatg	20
	<210> 4	
50	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> secuencia complementaria de un cebador	
	<400> 4	
	agrgtgacgg gcggtgt	17
60	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

# ES 2 632 206 T3

	<223> secuencia complementaria de un cebador	
	<400> 5	
5	aagtcgtaac atggtagtr tac	23
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia complementaria de un cebador	
15	<400> 6	
	catggtaggt gtaccggaag	20
	<210> 7	
20	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400> 7	
	tcacctct caagtatact tcaaaggaca	30
30	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 8	
40	gggattagat accccactat	20
	<210> 9	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 9	
	tcaagtcctt tgggtttaag	21
55	<210> 10	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 10	
65	ccactatgct tagccctaaa cctcaacag	29

# ES 2 632 206 T3

5	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 11	
10	cgagaagacc ctatggagct t	21
	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
20	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> n es a, c, g, o t	
25	<400> 12	
	cryggtcgcc ccaaccnaaa	20
30	<210> 13 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 13	
40	tggagcttta atttattaat gcaaacagta cctaacaaa	39
	<210> 14 <211> 51 <212> ADN <213> <i>Allobates brunneus</i>	
	<400> 14	
50	cctcttatac taaaaatagt tttaaccaa attcagccaa tcagaagagg t	51
	<210> 15 <211> 53 <212> ADN <213> <i>Alytes obstetricans</i>	
55	<400> 15	
	cctcaactaa ctcaaccccc taattaaata ctaaccagtt aacaagaaga ggc	53
60	<210> 16 <211> 53 <212> ADN <213> <i>Bombina bombina</i>	
65	<400> 16	

ES 2 632 206 T3

	cttcaactaa accaacacaa ttttaatac acaaaataag taaaagaaga ggt	53
	<210> 17	
	<211> 53	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Bombina variegata</i>	
	<400> 17	
10	cttcaactag aactgatata ttctaaaac ataaaacgag tacaagaaga ggt	53
	<210> 18	
	<211> 52	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Bufo bufo</i>	
	<400> 18	
20	cttcaaagct actaacctag ttctaacaa actaaagcat aacagaagag gc	52
	<210> 19	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Bufo calamita</i>	
25	<400> 19	
30	cttcaaggca ctgacatagt ttttaactaa cttagcaaa acagaagagg c	51
	<210> 20	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Bufo viridis</i>	
35	<400> 20	
40	cttcaaagca taaacaaagt ttttaacaag tttagcata acagaagagg c	51
	<210> 21	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dendrobates auratus</i>	
45	<400> 21	
50	cctcaacgct attttaaagt ttctacaca ttttagctgc atagaagagg c	51
	<210> 22	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Dendrobates tinctorius</i>	
	<400> 22	
55	cctcaacgct actttaaagt ttctacata ccttagctac atagaagagg c	51
	<210> 23	
	<211> 53	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Discoglossus pictus</i>	
	<400> 23	
65	cttcaacccg ccgtattcaa gtatttaa atatttgca aaaaagaaga ggc	53
	<210> 24	

ES 2 632 206 T3

	<211> 51 <212> ADN <213> <i>Hyla arborea</i>	
5	<400> 24  ctcaaagcc cggtagtagt aattaacta acttagcaaa tcagaagagg c	51
10	<210> 25 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Hyla meridionalis</i>	
15	<400> 25  ctcaaagcc taaacatcag taattaactc aaactagcac accagaagag gc	52
20	<210> 26 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Plethodon cinereus</i>	
25	<400> 26  catcaaatat attacttag aagagga	27
30	<210> 27 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Pleurodeles poireti</i>	
35	<400> 27  ctcaaacia tataaaaacc ctatataaac agaataaaaa gaaagaagag gc	52
40	<210> 28 <211> 53 <212> ADN <213> <i>Rana catesbeiana</i>	
45	<400> 28  cttcgatag atctcacc cgtcctaacc cactattaca tttagaaga ggc	53
50	<210> 29 <211> 54 <212> ADN <213> <i>Rana nigromaculata</i>	
55	<400> 29  cttcgatagc actcaccca ggtatttaac ccaataccgc atctagaag aggc	54
60	<210> 30 <211> 53 <212> ADN <213> <i>Rana pipiens</i>	
65	<400> 30  cttcgatag aaataatatt gtcctaacc cattatcacg tttagaaga agc	53
	<210> 31 <211> 52 <212> ADN <213> <i>Rana temporaria</i>	

ES 2 632 206 T3

	<400> 31	
5	cttcaatagt accccgtatg ttctaacc aacaccacgt tttagaagag gc	52
	<210> 32	
	<211> 55	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Salamandra salamandra</i>	
	<400> 32	
	cttcaaataa tttaaaaaa tcttaaataa ataaagtcag taagtaagaa gaggc	55
15	<210> 33	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> <i>Triturus cristatus</i>	
20	<400> 33	
	cttcaagaac tattagatat taataaaca aagaagaaaa aagaagaaga ggc	53
	<210> 34	
25	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> <i>Triturus marmoratus</i>	
	<400> 34	
30	cttcaagcac tattttatat taaataaaca aaaagaaaa agaagaagag gc	52
	<210> 35	
35	<211> 63	
	<212> ADN	
	<213> <i>Anguilla anguilla</i>	
	<400> 35	
	cctcgaataa caataaagac aattcataaa acaataagaa caaaaagagg aggcaagtcg	60
40	taa	63
	<210> 36	
	<211> 62	
	<212> ADN	
45	<213> <i>Barbus barbus</i>	
	<400> 36	
	ccccgtcaaa atgcacaaa atacctaag caacagcact gacaagggga ggcaagtcgt	60
	aa	62
50	<210> 37	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> <i>Clupea harengus</i>	
55	<400> 37	
	ccccagcgac cacccaaaa aggtaaataa cgcaataata acagcaaggg gaggcaagtc	60
	gtaa	64
60	<210> 38	
	<211> 63	

ES 2 632 206 T3

<212> ADN  
 <213> *Exocoetus volitans*

<400> 38

5 ccccaaaacc cctaaaaaga ttaagtaaaa ccatagatcc aataaagggg aggcaagtcg 60  
 taa 63

<210> 39  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> *Gadus morhua*

<400> 39

10 ctccaaataa accctagata ttacctaaaa tgctttttat aataagggga ggcaagtcgt 60  
 15 aa 62

<210> 40  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> *Hippocampus coronatus*

<400> 40

20 ccctaaaaca cacttaaaac taattaaaac aaaatattaa acaaggggag gcaagtcgta 60  
 25 a 61

<210> 41  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> *Labrus merula*

<400> 41

30 ccccagactt acgtatctta atacttaatg ccttataatt gcaaagggga ggcaagtcgt 60  
 aa 62

<210> 42  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> *Lota lota*

<400> 42

35 ctccaaatag accctaaata ttacctaaaa tgttttatat aataagggga ggcaagtcgt 60  
 aa 62

<210> 43  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 43

50 ccccaagttc aacctgtcct tctaactaag aagttaaccg aacaaagggg aggcaagtcg 60  
 taa 63

<210> 44

ES 2 632 206 T3

	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> <i>Salmo trutta</i>		
5	<400> 44		
	ccccgagttc aattaatcct tctaactaag aagttaaccg aacaaagggg aggcaagtcg	60	
	taa	63	
	<210> 45		
10	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> <i>Salvelinus alpinus</i>		
	<400> 45		
15	ccccagttt aatttatcct tctaactaag aagttaacca aacaaagggg aggcaagtcg	60	
	taa	63	
	<210> 46		
	<211> 63		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Salvelinus fontinalis</i>		
	<400> 46		
	ccccagttt aatttatcct tctaactaag aagttaacca aacaaagggg aggcaagtcg	60	
25	taa	63	
	<210> 47		
	<211> 65		
30	<212> ADN		
	<213> <i>Sardina pilchardus</i>		
	<400> 47		
	ccccaaac tacctataaa aatgtaacta acacaatatt cgccgcaagg ggaggcaagt	60	
35	cqtaa	65	
	<210> 48		
	<211> 61		
	<212> ADN		
40	<213> <i>Zeus faber</i>		
	<400> 48		
	cccctgttg cccccaacct ttcataaac ctttattaa caaaggggag gcaagtcgta	60	
	a	61	
45	<210> 49		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 49		
55	acaccgccg tcaccct	17	
	<210> 50		
	<211> 17		

# ES 2 632 206 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador

<400> 50

10 acaccgcccg tcaactct 17

<210> 51  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador

20 <400> 51

20 gtacacttac catgttacga ctt 23

<210> 52  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador

30 <400> 52

gtatacttac catgttacga ctt 23

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Par de oligonucleótidos, según el cual el primer oligonucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 4 y el segundo nucleótido se hibrida de manera selectiva a la secuencia SEC ID nº 5 o a la secuencia SEC ID nº 6 en unas condiciones de astringencias suficientes para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de los batracios y peces por reacción de polimerización en cadena (PCR).
- 10 2. Par de oligonucleótidos según la reivindicación 1, según el cual la región amplificada del gen mitocondrial 12S comprende menos de 95 nucleótidos.
- 15 3. Par de oligonucleótidos según la reivindicación 1 o 2, según el cual el primer oligonucleótido presenta una secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 y el segundo oligonucleótido presenta una secuencia nucleotídica SEC ID nº 2 o SEC ID nº 3.
- 20 4. Par de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la región amplificada por reacción de polimerización en cadena presenta una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC D nº 14-48.
- 25 5. Mezcla de cebadores para la amplificación de una región variable del gen mitocondrial 12S de los batracios y peces por reacción de polimerización en cadena (PCR) que comprende los cebadores de amplificación según las SEC ID nº 1, SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3.
- 30 6. Mezcla de cebadores según la reivindicación 5, que comprende además un cebador de bloqueo según la SEC ID nº 7.
- 35 7. Procedimiento de amplificación de una región del gen mitocondrial 12S de las especies de batracios y peces, que comprende las etapas siguientes:
- 40 a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de una especie de batracio y/o de pez;
- b) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una mezcla de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6.
- 45 8. Procedimiento de detección de una especie de batracio y/o de pez en una muestra, que comprende las etapas siguientes:
- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de una especie de batracio y/o de pez;
- 50 b) se aísla el ADN total contenido en la muestra;
- c) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una mezcla de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6; y
- 55 d) se detecta la eventual presencia de un producto de amplificación.
- 60 9. Procedimiento de detección y de identificación de una especie de batracio y/o de pez en una muestra, que comprende las etapas siguientes:
- a) se dispone de una muestra susceptible de contener ADN de una especie de batracio y/o de pez;
- b) se aísla el ADN total contenido en la muestra;
- 65 c) se realiza una reacción de amplificación en cadena utilizando un par de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una mezcla de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6;
- d) se detecta la presencia de un producto de amplificación: y
- e) se determina la secuencia del producto de amplificación para identificar la especie de batracio y/o de pez contenida en la muestra.
10. Kit para la detección de una especie de batracio y/o de pez en una muestra, que comprende un par de oligonucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una mezcla de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 y por lo menos un reactivo adicional.
11. Kit según la reivindicación 10, que comprende otro par de oligonucleótidos seleccionados de entre los pares de cebadores:

## ES 2 632 206 T3

- cebadores de amplificación según las SEC ID nº 8 y SEC ID nº 9, eventualmente con cebador de bloqueo según la SEC ID nº 10; y
- 5
- cebadores de amplificación según las SEC ID nº 11 y SEC ID nº 12, eventualmente con cebador de bloqueo según la SEC ID nº 13.