

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 232**

21 Número de solicitud: 201700642

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.10.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Sec. de Contratos y Patentes (OTRI). Fac.
Medicina (Edif. Entrepabellones 7 y 8). Dr. Severo
Ochoa, 7 Ciudad Universitaria
28040 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**PINGARRÓN CARRAZÓN, José Manuel;
CAMPUZANO RUIZ, Susana;
GALLEGO RODRIGUEZ, Francisco Javier;
LINACERO DE LA FUENTE, Rosario y
RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL, Víctor**

54 Título: **Método y kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas**

57 Resumen:

Método y kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas.

La presente invención se refiere a un método para detectar y/o cuantificar ADN de caballo en muestras aisladas, especialmente en mezclas de carne sospechosas de fraudes por inclusión de carne de caballo en mezclas de carnes económicamente más valoradas. La invención también se refiere a un kit que contiene los elementos para preparar un biosensor electroquímico amperométrico para detectar y/o cuantificar porcentajes de hasta el 0,5% de carne de caballo en mezclas de otras carnes, sin necesidad de extraer el ADN ni de realizar amplificaciones mediante la técnica de PCR. Dicho biosensor utiliza secuencias específicas del ADN mitocondrial de caballo, un anticuerpo detector de dúplex de ácidos nucleicos, una proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc de inmunoglobulinas y una molécula de generación y amplificación de la señal electroquímica.

ES 2 637 232 A1

DESCRIPCIÓN

5 Método y kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas

Sector de la técnica

10 La presente invención se encuadra en el sector de los métodos para realizar análisis de alimentos. Más concretamente, se encuadra en el sector de los métodos para la detección de la posible presencia de carne de caballo en mezclas de carne u otros alimentos y de los kits, basados en biosensores electroquímicos amperométricos, diseñados para la detección y cuantificación de ADN de caballo en mezclas de carne.

15 **Estado de la técnica**

En la actualidad, resulta de especial relevancia la detección de fraudes alimentarios y, en concreto, en productos cárnicos. Aunque la presencia de diferentes tipos de carne en otros productos de origen animal no suele representar un riesgo para la salud, son los consumidores quienes deben elegir en función de su estilo de vida, costumbres o creencias, qué es lo que consumen. Por otro lado, la inclusión de carnes no especificadas en los productos alimenticios suele tener como finalidad el fraude económico, ofreciendo productos costosos en los que se incluyen porcentajes variables de carnes de origen más económico.

25 En la Unión Europea, todos los ingredientes deben mencionarse en la etiqueta de los productos alimenticios envasados destinados al consumidor final. En particular, los productos alimenticios que contienen carne como ingrediente deben indicar también las especies animales de las que proviene esa carne. Es más, si se menciona un ingrediente en la denominación del alimento, su cantidad expresada en porcentaje deberá aparecer también en la lista de ingredientes para no inducir a error al consumidor sobre la identidad y la composición de los alimentos.

35 A raíz de los escándalos surgidos en Europa por adulteraciones con carne de caballo, se han realizado controles y se ha podido comprobar que algunos productos alimenticios envasados contenían carne de caballo no declarada en la lista de ingredientes que figura en el envase o en su etiqueta. Es más, el nombre de algunos

de esos productos alimenticios o la lista de sus ingredientes mencionaban engañosamente que solo contenían carne de vacuno.

5 Actualmente, existen numerosos ensayos y estrategias para detectar la adulteración de la carne y diferenciar las especies animales presentes en mezclas cárnicas; estos ensayos se basan fundamentalmente en técnicas inmunológicas, espectroscópicas o de biología molecular. En este sentido, las técnicas basadas en la identificación de proteínas específicas de especie mediante ensayos electroforéticos o mediante inmuoensayos no suelen ser suficientemente sensibles como para diferenciar
10 especies animales cercanas debido a la posibilidad de reacciones cruzadas, ni suficientemente fiables en productos tratados por calor debido a la desnaturalización y degradación de las proteínas que se producen por estos tratamientos térmicos. Por ello, los esfuerzos comenzaron a centrarse en ensayos basados en ADN, que es más estable que las proteínas a las altas temperaturas. En este sentido, durante las
15 últimas décadas, la técnica más utilizada ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) así como las mejoras y variaciones que han ido surgiendo partiendo de esta técnica (PCR en tiempo real, PCR múltiple, *Loop mediated isothermal amplification* -LAMP-). Por otro lado, se comprobó que se obtenían mejores resultados si la PCR se aplicaba a fragmentos de ADN mitocondrial, que
20 está más protegido y, por lo tanto, resiste mejor que el ADN nuclear a los posibles tratamientos térmicos y, además, está presente en múltiples copias. A continuación se indican algunos ejemplos de ello.

En la patente KR101296221B1 se utilizan secuencias del gen del ARN ribosómico
25 12S y secuencias del gen del citocromo B, ambos mitocondriales, para detectar por PCR carne de pollo, cabra, venado, cerdo, vaca, oveja y caballo.

La patente KR101448119B1 se basa en PCR múltiple y en el gen del citocromo B para detectar caballo, vacuno, cerdo, pollo, pato, faisán, pavo, venado, ganso, oveja,
30 conejo y perro en mezclas de carne de dos o más de estas especies.

S. Tanabe *et al.* describen, en Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 (2007) 3131–3135, un método de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de varias especies animales en alimentos: cerdo, pollo, ternera, cordero y caballo, cuyos cebadores
35 están diseñados a partir del gen del citocromo B. J.J. Dooley *et al.*, en Meat Science 68 (2004) 431–438, también utilizan secuencias del gen del citocromo B para

detectar especies animales en carnes utilizando PCR cuantitativa, en este caso, para diferenciar carne de vacuno, pollo, cordero, cerdo, pavo.

5 En CN104293899A, se utilizan pares de cebadores que amplifican fragmentos del ADN mitocondrial del caballo (COX1, COX2, COX3, ND5, ND6 y citocromo B) para detectar carne de esta especie incluso en muestras muy procesadas, y se propone una metodología de PCR cuantitativa en tiempo real.

10 CN104561327A utiliza pares de cebadores del gen mitocondrial COX1 para detectar carne de caballo y de asno mediante PCR cuantitativa de fluorescencia.

Otros documentos describen métodos que no utilizan técnicas de PCR. Por ejemplo: Ali *et al.* describen un método de detección de adulteración con carne de cerdo en alimentos crudos y en alimentos tratados por calor, en el que se utilizan
15 nanobiosondas híbridas compuestas por nanopartículas de oro y sondas de pequeño tamaño marcadas con fluoróforos. De nuevo, la sonda de elección pertenece a la secuencia del gen mitocondrial del citocromo B. (M.E. Ali, et al. J. Nanomaterials vol. 2011, Article ID 781098, 11 pages, 2011. doi:10.1155/2011/781098). Con este
20 método se alcanzan límites de detección (LOD) de 58,6pM para la diana sintética y 230µgL⁻¹ para el ADN total y se puede llegar a detectar un 1% de carne de cerdo en mezclas de carne sometidas a condiciones de temperatura y presión tales que degradan las dianas de ADN, lo que impide la detección de adulteraciones mediante técnicas de PCR.

25 En el caso de las adulteraciones con carne de caballo, no se conocen métodos que no utilicen la técnica de PCR y alcancen niveles de detección equivalentes a los descritos para este método de Ali *et al.* Es más, la Comisión Europea, en la Recomendación de la Comisión de 27 de marzo de 2014 (2014/180/UE), fijó en un
30 0,5% la detección de la presencia de carne de caballo en la carne (como relación de fracción en masa p/p) aunque sin determinar el método de detección de elección.

Descripción detallada de la invención

Método y kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas

35

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas, especialmente en muestras de

carne o mezclas de carne. Para ello, la invención se basa en un biosensor electroquímico con el que se puede realizar la detección amperométrica de ADN de caballo. Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que incluye el conjunto de elementos y productos necesarios para obtener dicho biosensor electroquímico para
5 detectar ADN de caballo en muestras aisladas.

Con el método de la invención se puede realizar una discriminación significativa de muestras de carne de vacuno sin contaminar frente a carnes de vacuno contaminadas con 0,5% (p/p), o mayor porcentaje de carne de caballo, en tan solo
10 60 minutos. Además, esta discriminación puede incluso realizarse empleando directamente lisados mitocondriales, sin necesidad de extraer ni purificar previamente el ADN y, lo que es más importante, sin necesidad de amplificarlo ni mediante PCR tradicional, ni mediante ninguna de sus mejoras o variantes.

15 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de ADN de caballo en muestras aisladas que incluye:

- a. – unir al menos una molécula de una sonda con una secuencia diana específica de ADN o de ARN a partículas magnéticas;
- b. - poner en contacto las partículas magnéticas del paso a. con la/s muestra/s en las
20 que se desea detectar y/o cuantificar el ADN de caballo;
- c. - incubar las partículas magnéticas del paso b. con un anticuerpo detector, o un fragmento de anticuerpo detector, específico antihomoduplex ADN/ADN o antiheteroduplex ARN/ADN;
- d. - incubar las partículas magnéticas del paso c. con una proteína bacteriana con
25 capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, conjugada con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
- e. – capturar las partículas magnéticas del paso d. sobre electrodos impresos de trabajo previamente colocados sobre un soporte magnético;
- 30 donde la sonda del paso a. tiene una longitud de entre 15 y 144 pb y está comprendida en SEQ ID NO: 2, la secuencia inversa a SEQ ID NO: 2 o la transcripción a ARN de cualquiera de las dos anteriores.

Las partículas magnéticas que se utilizan en este método pueden ser o no
35 superparamagnéticas, es decir, pueden ser partículas con propiedades paramagnéticas aún por debajo de determinadas temperaturas críticas. Pueden ser

micropartículas o nanopartículas, abarcando así tamaños de diámetro que van desde los 10 µm a los 100 nm y de los 100 a los 10 nm, respectivamente.

Las distintas sondas de captura que se pueden utilizar están diseñadas a partir de la
 5 región D-loop del ADN mitocondrial de caballo. La región D-loop es la principal área
 no codificante de la molécula de ADN mitocondrial y, debido a su alta tasa de
 mutación, entre otras características, es un magnífico sistema de marcadores para
 estudios filogenéticos. Se considera un marcador de diversidad y por ello se ha
 utilizado frecuentemente para realizar estudios de variabilidad genética y análisis
 10 comparativos arqueológicos y del origen histórico de varias razas europeas y
 americanas de caballos (McGahern, AM. *et al.* Anim. Genet. 37 (2006) 498–502;
 Cardinali I, *et al.* PLoS ONE 11(4) (2016): e0153004. doi:10.1371/journal.pone.
 0153004). Sin embargo, al analizar las secuencias de esta región publicadas en la
 base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, EEUU) se halló
 15 una región exclusiva del caballo que, además, se mantenía constante en los
 animales de esta especie. Esta región comprende 144 pb y está caracterizada por
 SEQ ID NO: 2. Para unir las a las partículas magnéticas, se utilizan sondas incluidas
 en esta región cuyas secuencias, preferentemente, pueden variar entre las 15 y las
 144 pb y son complementarias a los correspondientes fragmentos de entre 15 y 144
 20 pb de SEQ ID NO: 2. Además, pueden utilizarse sondas de captura de ADN o bien
 sondas de captura de su transcripción a ARN, y ambas pueden ser complementarias
 a una u otra hebra del ADN. También pueden utilizarse sondas de captura cuyas
 secuencias presentan un 98% de identidad con cualquiera de las cuatro secuencias
 anteriores, entendiendo por porcentaje de identidad de una secuencia el porcentaje
 25 de coincidencias de los mismos nucleótidos entre dos secuencias alineadas, a lo
 largo de toda la longitud de ambas secuencias.

Una de las diferencias que implica utilizar sondas de captura de ADN o de ARN es el
 tipo de anticuerpo de detección que se utilizará en el método de detección y
 30 cuantificación de ADN de caballo. En caso de que la sonda de captura sea de ARN,
 se utiliza un anticuerpo específico antiheteroduplex, como son el anticuerpo
 monoclonal AbS9.6, de Kerfast, o el anticuerpo monoclonal D5H6, de Covalab. Si
 se utiliza una sonda de captura de ADN, el anticuerpo que se emplea es específico
 antihomoduplex, es decir, se trata de anticuerpos anti-DNA de doble cadena, que
 35 solo pueden unirse a la polirribosa-fosfato, a los pares de bases desoxiguanosina-
 desoxicidina y desoxiadenosina-desoxitimidina y a algunas conformaciones muy
 especiales de la doble hélice. Por otro lado, otra opción de la invención es utilizar

fragmentos de los anticuerpos específicos antiheteroduplex o antihomoduplex siempre y cuando mantengan dicha especificidad. En una realización preferida, se utiliza una sonda de ARN caracterizada por SEQ ID NO: 3 o por SEQ ID NO: 4 y un anticuerpo antiheterodúplex ARN/ADN.

5

Para unir la sonda que tiene una secuencia diana específica de ADN o de ARN a las partículas magnéticas se pueden utilizar varios sistemas. Las partículas magnéticas se funcionalizan con un primer elemento de unión que, mediante una interacción covalente o no covalente, permite la unión de la sonda de ADN o de ARN mediante un segundo elemento de unión. Por ejemplo, la molécula de ADN o ARN se puede conjugar con una secuencia peptídica corta capaz de formar una interacción covalente o no covalente con una molécula proteica que se ha unido covalentemente a la partícula magnética a través de un entrecruzamiento con un grupo sulfhidrilo o una amina; otra opción es conjugar la molécula de ARN o ADN con un aminoácido y unirlo covalentemente a las partículas magnéticas activadas mediante ésteres NHS (N-Hidroxisuccinimida). Por otro lado, cabe indicar que a cada partícula magnética pueden unírsele varias moléculas de la sonda de ADN o ARN con la secuencia diana específica seleccionada.

El primer elemento de unión con el que se modifican las partículas magnéticas puede ser biotina, proteínas de unión a análogos de biotina, grupos COOH, grupos tosilo y/o secuencias específicas de ADN. Entre las proteínas de unión a análogos de biotina, se pueden utilizar estreptavidina, avidina, espiavidina, neutravidina, traptavidina y/o anticuerpos antibiotina. En cuanto a las secuencias específicas de ADN pueden ser las conocidas como "colas", es decir, secuencias de entre 4 y 30 adeninas (A) o entre 4 y 30 timinas (T). El segundo elemento de unión de la sonda de ADN o de ARN a las partículas magnéticas modificadas puede ser: biotina, análogos de biotina, grupos amino y/o bases complementarias a las secuencias específicas de ADN, a las "colas", que se comentaban en el párrafo anterior. Entre los análogos de biotina se pueden utilizar: digoxigenina, biotinpropanol, moléculas de biotina marcadas con fluoresceína. En una realización preferida de la invención, el primer elemento de unión es estreptavidina y el segundo elemento de unión es biotina. En la presente memoria, las sondas biotiniladas ARN de captura se denominan en bRNACp y las sondas biotiniladas ADN de captura se denominan bDNACp, indicándose a continuación el número de bases que caracteriza a cada sonda concreta.

Una vez las partículas magnéticas y las moléculas de la sonda específica de ARN o de ADN están unidas, se ponen en contacto con la muestra aislada en la que se desea detectar la posible presencia, o no, de carne de caballo y, en su caso, cuantificarla. Para ello, se pueden seguir dos procedimientos: dado que la secuencia
5 diana se ha seleccionado en el ADN mitocondrial (ADNmt), se puede realizar una extracción y purificación del ADNmt y utilizarlo como muestra aislada; otra opción es obtener un lisado mitocondrial y, sin extraer el ADN presente en dicho lisado, usarlo como muestra aislada. En una realización preferida de la invención, no es necesario extraer el ADNmt de la muestra utilizándose lisados mitocondriales para la detección
10 y/o cuantificación de ADN de caballo, lo que simplifica mucho el ensayo y ahorra tanto tiempo como coste.

A continuación se realiza una amplificación de la respuesta que implica el uso combinado de un anticuerpo específico frente a heterodúplex de ADN/ARN o frente a
15 homodúplex de ADN/ADN, o un fragmento del anticuerpo detector que mantiene su especificidad, (como se ha comentado más arriba) y una proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugada con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica. La proteína bacteriana puede ser Prot A o Prot G y la molécula de
20 generación y amplificación de la señal se puede seleccionar entre HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina. HRP es una peroxidasa (*horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante) que existe también en varias formas poliméricas (poli-HRP20, poli-HRP40, poli-HRP80). En una realización preferida de la invención la amplificación de la señal se obtiene mediante la utilización de Prot A conjugada con poli-HRP40.

25 Los soportes magnéticos sobre los que se colocan los electrodos impresos de trabajo incluyen un imán que puede estar unido al soporte magnético o bien embebido en la propia estructura del soporte magnético. Preferentemente, el imán es de neodimio que asegura la captura magnética de las partículas magnéticas de
30 manera estable, reproducible y localizada sobre el electrodo de trabajo.

El "electrodo de trabajo" o "electrodo impreso de trabajo" para la transducción electroquímica puede ser rígido o flexible. Preferentemente, el biosensor electroquímico que se describe en esta memoria comprende un electrodo de trabajo
35 rígido realizado con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, electrodos impresos, plata, mercurio, grafito, carbón vítreo, nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido

metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro. Preferentemente, el electrodo de trabajo que se utiliza en este método es un electrodo impreso de carbono.

- 5 Algunos de los pasos que se han descrito para este método pueden realizarse simultáneamente, lo que acorta el tiempo de detección y/o cuantificación de la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas. Por un lado, la incubación con el anticuerpo detector, o con un fragmento del anticuerpo detector, puede realizarse al mismo tiempo que la incubación para la generación y amplificación de la señal electroquímica. Por otro lado, estas dos incubaciones pueden simultanearse también con la incubación en la que se ponen en contacto las partículas magnéticas que ya llevan la sonda específica de ADN o de ARN unida a su superficie con la muestra aislada, de manera que se unen en una sola incubación los pasos b., c. y d. del método de la invención. En una realización preferida de la invención, se realizan simultáneamente los pasos b., c. y d. o, al menos, los pasos c. y d.

De esta manera, el método de detección y/o cuantificación de ADN de caballo puede completarse en 60 minutos a partir de las partículas magnéticas modificadas con la sonda específica de ARN o ADN sin necesidad de recurrir a la amplificación por PCR de ninguna secuencia diana en las muestras aisladas, ya sean de carne, mezclas de carne o cualquier otro tipo de muestra, con las ventajas prácticas que esto supone en términos de número de reactivos e instrumentación (por ejemplo, no es necesario el termociclador que se utiliza para realizar la PCR) requeridos para realizar la determinación.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas que incluye:

- partículas magnéticas modificadas con un primer elemento de unión al que se une al menos una molécula de una sonda de ADN o de ARN por medio de un segundo elemento de unión;
- un anticuerpo detector, o un fragmento de anticuerpo detector, específico antihomoduplex ADN/ADN o antiheteroduplex ARN/ADN;
- una proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, conjugada con una molécula de generación y amplificación de la señal electroquímica;
- y un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético;

en el que la sonda tiene una longitud de entre 15 y 144 pb y está comprendida en SEQ ID NO: 2, la secuencia inversa a SEQ ID NO: 2 o la transcripción a ARN de cualquiera de las dos anteriores.

- 5 Las partículas magnéticas que incluye este kit para conformar el biosensor electroquímico de la invención pueden ser o no superparamagnéticas, es decir, pueden ser partículas con propiedades paramagnéticas aún debajo de determinadas temperaturas críticas. Pueden ser micropartículas o nanopartículas, abarcando así tamaños de diámetro que van desde los 10 μm a los 100 nm y de los 100 a los 10
10 nm, respectivamente.

Las distintas sondas de captura que puede incluir el kit están diseñadas a partir de la región D-loop del ADN mitocondrial de caballo, más concretamente a partir de una región de 144 pb caracterizada por SEQ ID NO: 2 su inversa o la transcripción a
15 ARN de cualquiera de las dos anteriores, o bien secuencias con un 98 % de identidad con cualquiera de las cuatro anteriores. Preferentemente, el kit incluye la sonda caracterizada por SEQ ID NO: 4 o por SEQ ID NO: 3.

Para unir las a las partículas magnéticas, el kit de la invención contiene sondas
20 incluidas en la región de 144 pb cuyas secuencias, preferentemente, pueden variar entre las 15 y las 144 pb y son complementarias a los correspondientes fragmentos de entre 15 y 144 pb de SEQ ID NO: 2. Además, puede incluir sondas de captura de ADN o bien sondas de captura de su transcripción a ARN, y ambas pueden ser complementarias a una u otra hebra del ADN.

25 Cuando la sonda de captura incluida en el kit es de ARN, se incluye un anticuerpo específico antiheteroduplex, como son el anticuerpo monoclonal AbS9.6, de Kerafast, o el anticuerpo monoclonal D5H6, de Covalab. Cuando se incluye en el kit una sonda de captura de ADN, el anticuerpo que incorpora el kit es específico
30 antihomoduplex, es decir, se trata de un anticuerpo anti-DNA de doble cadena, que solo puede unirse a la polirribosa-fosfato, a los pares de bases desoxiguanosina-desoxicidina y desoxiadenosina-desoxitimidina o a algunas conformaciones muy especiales de la doble hélice. En otra realización de la invención, se incluyen en el kit fragmentos de los anticuerpos específicos antiheteroduplex o antihomoduplex que
35 mantienen dicha especificidad. En una realización preferida, se utiliza una sonda de ARN caracterizada por SEQ ID NO: 3 o por SEQ ID NO: 4 y un anticuerpo antiheteroduplex ARN/ADN.

La sonda de captura de ADN o de ARN puede estar unida a las partículas magnéticas según distintos sistemas. Las partículas magnéticas funcionalizadas con un primer elemento de unión, mediante una interacción covalente o no covalente, se unen a la sonda de ADN o de ARN que incorpora un segundo elemento de unión. Por ejemplo, la molécula de ADN o ARN puede estar conjugada con una secuencia peptídica corta capaz de formar una interacción covalente o no covalente con una molécula proteica que está unida covalentemente a la partícula magnética a través de un entrecruzamiento con un grupo sulfhidrilo o una amina; otra opción es que la molécula de ARN o ADN esté conjugada con un aminoácido y unir este aminoácido covalentemente a las partículas magnéticas activadas mediante ésteres NHS. Por otro lado, cabe indicar que en el kit que da lugar al biosensor electromagnético de la invención cada partícula magnética puede tener unidas varias moléculas de la sonda de ADN o ARN con la secuencia diana específica seleccionada.

El primer elemento de unión de las partículas magnéticas puede seleccionarse del grupo formado por: biotina, proteínas de unión a análogos de biotina, grupos COOH, grupos tosilo y/o secuencias específicas de ADN. Las proteínas de unión a análogos de biotina se pueden seleccionar entre: estreptavidina, avidina, espiavidina, neutravidina, traptavidina y/o anticuerpos antibiotina. En cuanto a las secuencias específicas de ADN pueden ser las conocidas como "colas", es decir, secuencias de entre 4 y 30 adeninas (A) o entre 4 y 30 timinas (T). El segundo elemento de unión de la sonda de ADN o de ARN a las partículas magnéticas modificadas puede ser: biotina, análogos de biotina, grupos amino y/o bases complementarias a las secuencias específicas de ADN, a las "colas", que se comentaban en el párrafo anterior. Entre los análogos de biotina el kit puede incluir: digoxigenina, biotinpropanol, moléculas de biotina marcadas con fluoresceína. En una realización preferida de la invención, el primer elemento de unión es estreptavidina y el segundo elemento de unión es biotina.

La proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector o fragmento de anticuerpo detector puede seleccionarse entre Prot A y Prot G. La molécula de generación y amplificación de la señal se puede seleccionar entre HRP, poli-HRP (poli-HRP20, poli-HRP40, poli-HRP80) o fosfatasa alcalina. En una realización preferida de la invención el kit incluye Prot A conjugada con poli-HRP40.

Los soportes magnéticos sobre los que se colocan los electrodos impresos de trabajo incluyen, preferentemente, un imán de neodimio.

5 El “electrodo de trabajo” o “electrodo impreso de trabajo” que incluye el kit, para la transducción electroquímica, puede ser rígido o flexible. Preferentemente, el biosensor electroquímico de la invención comprende un electrodo de trabajo rígido realizado con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, electrodos impresos, plata, mercurio, grafito, carbón vítreo, nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido metálico, pasta
10 de carbono, diamante y compuestos dopados con boro. El kit de la invención, preferentemente, incluye un electrodo impreso de carbono.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit como el que se ha descrito en este apartado para detectar y/o cuantificar la presencia de carne de caballo en
15 mezclas de carne, especialmente, para detectar y cuantificar posibles fraudes cometidos al añadir un elemento más barato (carne de caballo) a otro más valioso (como puede ser la carne de vacuno).

Breve descripción de las figuras

20

Figura 1. Especificidad de SEQ ID NO: 2 para detectar carne de caballo. Fragmentos amplificados por PCR en un gel de agarosa (1,8%) partiendo de 5,0; 1,0 y 0,5 ng de ADN extraído a partir de carne de caballo (H.M.) y 5 ng de ADN extraído de carne de vacuno (B.M.) utilizando distintos métodos y kits comerciales de
25 extracción de ADN total (A) y ADNmt (B y C). El control negativo C (-) consiste en una PCR convencional realizada en ausencia de ADN.

Figura 2. Influencia de la longitud de la sonda biotilada de captura inmovilizada en Strep-MB sobre la respuesta amperométrica medida con el biosensor de la invención
30 para 0,0 (B, columnas blancas) y 0,1 nM (S, columnas grises) de la secuencia diana SEQ ID NO: 1 y los correspondientes valores de la relación S/B (rombos rojos). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

Figura 3. Influencia del número de etapas empleadas para realizar el ensayo sobre
35 las respuestas amperométricas medidas con el biosensor de la invención que incluye bRNACp-40bp y ProtA-HRP40 para 0,0 (B, columnas blancas) y 0,1 nM (S, columnas grises) de la secuencia sintética SEQ ID NO: 1 y los correspondientes

valores de la relación S/B (rombos rojos). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

5 **Figura 4.** Gráficos de calibración obtenidos para la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1 con el biosensor que incluye bRNACp-40bp y ProtA-HRP40 (negro), el biosensor que incluye bRNACp-40bp y ProtA-HRP (rojo) y un procedimiento convencional tipo sándwich (azul). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

10 **Figura 5.** Discriminación entre carne de vacuno (B.M., barras blancas rayadas) y de caballo (H.M., barras granate sólidas) a partir de ADN mitocondrial extraído. Se muestran las respuestas amperométricas medidas con un biosensor de la invención que incluye bRNACp-40pb y ProtA-HRP40 para distintas cantidades de ADN mitocondrial extraído. Las barras de error se estimaron como el triple de la
15 desviación estándar (n=3).

Figura 6. Discriminación de carne de vacuno y de caballo empleando lisados mitocondriales preparados a partir de 3.0 g de carne de ternera (B.M., barras blancas rayadas) o caballo (H.M., barras granate sólidas). Se muestran las respuestas
20 amperométricas medidas con un biosensor de la invención que incluye bRNACp-40pb y ProtA-HRP40 para distintas diluciones de los lisados mitocondriales en solución bloqueante de caseína. Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

25 **Figura 7.** Respuesta amperométrica medida con un biosensor de la invención que incluye bRNACp-40pb y ProtA-HRP40 a partir de lisados mitocondriales diluidos 1:1 de carne vacuno (barra rosa), pavo (barra azul), cerdo (barra naranja), pollo (barra amarilla) y caballo (barra granate) e incluyendo un control negativo (barra blanca). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

30 **Figura 8.** Dependencia de las señales amperométricas obtenidas con el biosensor de la invención para lisados mitocondriales diluidos 1:1 con solución bloqueante de caseína y obtenidos a partir de 3,0 g de muestras de carne de vacuno sin contaminar (círculo rojo) y contaminadas con diferentes porcentajes de carne de caballo
35 (cuadrados negros) (en el eje de abscisas se representa el porcentaje (%) de

adulteración). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

5 **Figura 9a.** Señales amperométricas proporcionadas por el biosensor de la invención para los lisados mitocondriales obtenidos a partir de muestras 100% carne de vacuno, 99,5/0,5% vacuno/caballo y 99/1% vacuno/caballo (en abscisas se representa el porcentaje (%) de adulteración indicándose el porcentaje de carne de caballo incluido en la muestra). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

10

Figura 9b. Dependencia lineal entre la corriente catódica medida y el porcentaje de carne de caballo utilizado en la mezcla de carnes de las muestras, en el intervalo de 1,0 a 10,0% (% de adulteración). Las barras de error se estimaron como el triple de la desviación estándar (n=3).

15

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1. Diseño de las sondas de ARN.

20 Para seleccionar una región de ADN invariable en caballos y ausente en el resto de mamíferos, se analizaron las secuencias de la región D-loop del ADN mitocondrial (ADNmt) publicadas en la base de datos NCBI. A partir de la secuencia publicada en Gen Bank con la referencia: DQ327940 y que incluye 851 pb de ADN mitocondrial de caballo, del haploide ID65 D-loop descrito por McGahern *et al.* (McGahern, AM. *et al. Anim. Genet.* 37 (2006) 498–502), se seleccionó como secuencia diana un
25 fragmento de 48 pb, caracterizado por SEQ ID NO: 1.

A partir de SEQ ID NO: 1, se diseñaron varias sondas biotiniladas en el extremo 5', de ARN o de ADN, para analizar el funcionamiento del biosensor con fragmentos de distinto tamaño y distinta secuencia que incluían total o parcialmente SEQ ID NO: 1.

30 Entre ellas, se diseñaron:

- una sonda de ADN de 144 pb caracterizada por SEQ ID NO: 2 (bDNACp-144pb) y biotinilada en el extremo 5', para cuya amplificación por PCR se utilizaron los cebadores EQ2 F (*forward*) y EQ2 R (*reverse*) caracterizados por SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente;
- 35 - una sonda de ARN de 40 pb caracterizada por SEQ ID NO: 3 y biotinilada en el extremo 5' (bRNACp-40pb);

- una sonda de ARN de 24 pb caracterizada por SEQ ID NO: 4 y biotinilada en el extremo 5' (bRNACp-24pb).

5 Para amplificar el fragmento caracterizado por SEQ ID NO: 2, se realizó una PCR en un volumen total de 20µl, en el que se preparó una mezcla con 10 µl de la mezcla lista para utilizar de Biotools "DNA AmpliTools Fast Mix 2x", 5pmol de cada cebador (SEQ ID NO: 5 y 6), 2 µl de ADN y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen. Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que incluyeron una desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, un
10 anillamiento a 55°C durante 30 segundos y un paso final de elongación a 72°C durante 5 minutos. Los cebadores y las demás sondas se encargaron a Sigma-Aldrich.

15 **Ejemplo 2. Preparación de las partículas magnéticas modificadas con sondas biotiniladas de captura.**

Se realizaron dos lavados con tampón B&W (10 mM Tris-HCl con 1 mM EDTA y 2 M NaCl, pH 7,5) de 5 µl de una suspensión comercial de partículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Strep-MB, 2,8 µm de diámetro, 10 mg mL⁻¹, Dynabeads M-280 Streptavidin, 11206D -Dynal Biotech ASA-). Tras cada lavado, las
20 Strep-MB se concentraron magnéticamente durante 3 minutos en un concentrador magnético, y se desechó el sobrenadante. Se incubaron durante 15-90 minutos en distintos ensayos (en agitación a 950 rpm y 37°C) en 25 µl de una solución con la sonda de captura biotinilada en el extremo 5' (0,1 µM bRNACp o 0,1 µM cDNACp) preparada en tampón B&W. A continuación, las Strep-MB modificadas (bRNACp-MB o bDNACp-MB) se lavaron dos veces con 50 µl de una solución comercial
25 bloqueante de caseína (1% de caseína purificada en PBS).

En este paso, las bRNACp-MB o las bDNACp-MB se almacenaron, hasta el momento de su utilización, en tampón B&W pH 6,0 filtrado y a 4°C.

30

Ejemplo 3. Preparación de las muestras.

Todas las muestras de carne empleadas (ternera, caballo, pavo, cerdo y pollo) se adquirieron en un supermercado local y se almacenaron a -80°C. Para su determinación cada una de estas muestras de carne se trituró y homogeneizó con
35 nitrógeno líquido mediante el uso de un mortero. A partir de las carnes trituradas se prepararon muestras de carne de vacuno con diferentes cantidades de carne de caballo (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25 y 50% (p/p)).

Ejemplo 4. Extracción del ADN mitocondrial y preparación de lisados mitocondriales.

A partir de las muestras de carne preparadas según el ejemplo 3, se procedió a evaluar dos procedimientos distintos.

Extracción ADNmt. Para aislar las mitocondrias de las muestras, se trituraron 3 g de cada muestra de carne en 15 ml de Solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) y se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, el sobrenadante se centrifugó una segunda vez a 12000 durante 10 minutos, a 4°C. El sedimento se resuspendió en 800 µl de solución MLB (150 mM NaCl, 50 mM Na₂EDTA y 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) y, a continuación, se añadieron 400 µl de solución de SDS (2% SDS en 0,4 N NaOH) y 800 µl de Solución III (29,5% (v/v) ácido acético glacial, pH 4,8), agitando manualmente, y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, a 25°C, y el ADNmt se extrajo del sobrenadante mediante el kit de purificación *Speedtools plasmid DNA purification kit* (Biotools).

Lisado mitocondrial. Para aislar las mitocondrias de las muestras, se trituraron 3 g de cada muestra de carne en 15 ml de Solución I y se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, el sobrenadante se centrifugó una segunda vez a 12000 durante 10 minutos, a 4°C. Se resuspendió la masa mitocondrial obtenida en 200 µl de solución MLB y 100 µl de solución de SDS y así se obtuvieron los lisados mitocondriales.

25

Ejemplo 5. Comprobación de la especificidad de la región de ADNmt seleccionada.

Se extrajo el ADNmt de carne de caballo (H.M.) y de carne de vacuno (B.M.) tal y como se indica en el ejemplo 4 y, a continuación, se realizó una amplificación por PCR de la región caracterizada por SEQ ID NO: 2 utilizando los cebadores caracterizados por SEQ ID NO: 5 y 6 y siguiendo el procedimiento indicado en el ejemplo 2.

En la figura 1 se muestra la elevada especificidad de los cebadores utilizados y del fragmento seleccionado.

35

Ejemplo 6. Detección de la secuencia diana.

Para probar el biosensor, se realizaron ensayos con las micropartículas magnéticas modificadas bRNACp-MB y bDNACp-MB, obtenidas según se explica en el ejemplo 2 con una incubación de 60 minutos, y con muestras de ADNmt extraído o bien
 5 lisados mitocondriales sin extracción del ADN, como se ha descrito en el ejemplo 4.

Las micropartículas magnéticas modificadas con sondas biotiniladas de captura (bRNACp-40bp-MB, bRNACp-24bp-MB, bDNACp-144bp-MB) se incubaron en distintos ensayos durante entre 15 y 90 minutos (en agitación a 950 rpm y 37°C) en
 10 25 µl de una solución que contenía la secuencia diana de ADN, caracterizada por SEQ ID NO: 1. Tras dos lavados con 50 µl de solución bloqueante de caseína, cada mezcla se incubó en distintos ensayos durante entre 15 y 90 minutos en 25 µl de una solución con un anticuerpo anti-ADN/ADN o anti-ARN/ADN (2µgmL⁻¹) y ProtA unida a poli-HRP40 (1µgmL⁻¹), que se preparó con anterioridad en solución bloqueante de
 15 caseína e incubando durante 1 hora. Después de dos lavados adicionales con solución bloqueante de caseína, se resuspendieron las micropartículas magnéticas modificadas con sondas biotiniladas de captura en 45 µl de un tampón PBS (0,05M, pH 6,0) para realizar la detección amperométrica.

Ejemplo 7. Detección amperométrica.

Los 45 µl de suspensión de las MB modificadas, como en el ejemplo 6, resultantes del ensayo de incubación con la secuencia diana de 30 minutos e incubación con el anticuerpo y con ProtA-poly-HRP40 también de 30 minutos, se pipetearon sobre los
 25 electrodos impresos de carbono (SPCE) donde resultaron capturadas magnéticamente sobre la superficie de los electrodos de trabajo colocados en los elementos de soporte magnético. Las mediciones amperométricas se realizaron en soluciones en agitación mediante la inmersión de los SPCE, ensamblados en los elementos de soporte magnético, en una célula electroquímica con 10 ml de 0,05 M PBS (pH 6,0) y 1,0 mM hidroquinona (HQ) preparada justo en el momento de realizar
 30 la medición electroquímica, y aplicando un potencial de detección de -0,20 V frente a un electrodo de plata de pseudoreferencia.

Las mediciones amperométricas se realizaron con un potencióstato 812B de CH Instruments (Austin, TX) mediante el *software* CHI812B. Como transductores electroquímicos, junto con un conector de cable específico (DRP-CAC, DropSens, España), se utilizaron SPCE (DRP-110, DropSens, España), compuestos de un
 35 electrodo de trabajo de carbono de 4 mm de diámetro, un contraelectrodo de

carbono y un electrodo de Ag de pseudorreferencia. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Se utilizó un imán de neodimio (AIMAN GZ) incrustado en una envoltura de Teflón para capturar magnéticamente de forma reproducible las MB modificadas en la superficie de los SPCE. Una vez establecida la base de referencia, se añadieron 50 µl de una solución de H₂O₂ (0,1M) y se registró la corriente hasta que se alcanzó el estado estacionario. Se comprobó que la magnitud de la corriente catódica medida y la concentración de ADN diana eran directamente proporcionales.

En todos los ensayos en los que se evaluaron las diferentes variables experimentales, el criterio de selección fue la relación más alta entre la respuesta amperométrica medida a -0,20 V (vs. el electrodo de Ag de pseudorreferencia) para 0,0 (blanco, B) y 0,1 nM de la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1 (señal, S), es decir, la relación S/B.

15

Ejemplo 8. Diferencias en la longitud de las sondas biotiniladas de captura frente a la secuencia diana.

En este ejemplo, se probaron sondas de ARN de distinto tamaño inmovilizadas sobre Strep-MB. Como anticuerpo, se utilizó un anticuerpo monoclonal específico de heterohíbridos de ADN/ARN (clon D5H6, de Covalab) Cuando se utilizó bRNACp-40pb, las respuestas amperométricas fueron 2,2 veces superiores a las medidas obtenidas con bRNACp-24pb. En la Figura 2 se aprecia la diferencia de la respuesta obtenida con ambas sondas.

Ejemplo 9. Diferencias en el número de pasos del procedimiento de hibridación.

Protocolo en 1 etapa: la hibridación y el marcaje se realizaron en un único paso incubando durante 30 minutos las bRNACp-40-MB en una solución que contenía una mezcla de la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1, el anticuerpo antiDNA/RNA (clon D5H6, de Covalab) y el complejo ProtA-poli-HRP40.

Protocolo en 2 etapas: en un primer momento se llevó a cabo un paso de hibridación incubando las bRNACp-40-MB con la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1 durante 30 minutos y, posteriormente, se realizó el marcaje de la unión de ambos elementos incubándolos durante 30 minutos con una mezcla del anticuerpo antiDNA/RNA (clon D5H6, de Covalab) y el complejo ProtA-poli-HRP40.

Protocolo en 3 etapas: se realizó primero la hibridación de la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1 con las bRNACp-40-MB durante 30 minutos; seguida de otra incubación de 30 minutos con el anticuerpo antiDNA/RNA (clon D5H6, de Covalab) y una tercera incubación con el complejo ProtA-poli-HRP40, durante 30 minutos más.

Los tres protocolos dieron resultados positivos, si bien los dos primeros fueron mejores que el tercero, como se puede apreciar en la figura 3.

Ejemplo 10. Comparación con un ensayo convencional tipo sándwich.

En la figura 4 se muestra el gráfico de calibración para la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1 utilizando ProtA-poli-HRP40 (en negro), ProtA-poli-HRP (en rojo) y una estrategia convencional tipo sándwich (en azul). Se comprobó una dependencia lineal ($r = 0,9984$) con la concentración de ADN sintético entre 0,39 y 75 pM, con valores de pendiente e intercepción de $91.796 \pm 728 \text{ nA nM}^{-1}$ y $244 \pm 20 \text{ nA}$, respectivamente. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LQ) se calcularon de acuerdo con los criterios de $3x_{s_b}/m$ y $10x_{s_b}/m$, respectivamente, donde "m" es la pendiente del gráfico de calibración lineal y " s_b " se estimó como la desviación estándar de diez medidas amperométricas obtenidas en ausencia de la secuencia diana caracterizada por SEQ ID NO: 1. Se obtuvieron valores de 0,12 y 0,39 pM (3,0 y 9,75 attomol), respectivamente. En la Tabla 1 se resumen las características analíticas de la comparativa realizada.

El sensor convencional tipo sándwich contenía una sonda de ADN biotinilada de captura caracterizada por SEQ ID NO: 7 y una sonda de detección también biotinilada caracterizada por SEQ ID NO: 8, que se marcó enzimáticamente con Strep-HRP.

Tabla 1. Comparación de las características analíticas de biosensores construidos siguiendo distintas estrategias.

Parámetro	Ensayo convencional tipo sándwich con Strep-HRP	bRNACp-24bp/ProtA-poli-HRP40	bRNACp-40bp/ProtA-HRP	bRNACp-40bp/ProtA-poli-HRP40
Intervalo lineal	812-50.000	1,4-250	2,5-100	0,39-75

/pM				
r ²	0,999	0,999	0,999	0,998
Pendiente /nA nM ⁻¹	119,0 ± 1,3	40.629 ± 295	9.986 ± 80	91.796 ± 728
Intercepción /nA	86 ± 27	206 ± 25	51 ± 4	244 ± 20
Factor de amplificación vs. convencional	—	341	84	771
LOD/pM	157	0,4	0,8	0,12
Duración del ensayo, min	60	60	60	60

Ejemplo 11. Detección de ADN de caballo en ADNmt extraído.

Se comprobó la utilidad del biosensor para discriminar entre carne de vacuno y de caballo mediante el análisis de diferentes cantidades de ADNmt extraído a partir de carne de ambas especies, siguiendo las indicaciones del ejemplo 4. Se utilizó el biosensor con bRNACp-40pb utilizando ProtA-poli-HRP40. Como se puede comprobar en la figura 5, fue posible diferenciar claramente entre ambos tipos de carne sin necesidad de recurrir a la amplificación de ningún fragmento de ADN mediante ningún tipo de técnica de PCR siempre que se utilizaban cantidades de ADNmt iguales o superiores a 50ng. En la figura 5 también se ve una disminución en la respuesta amperométrica cuando las cantidades de ADN eran muy elevadas, hecho atribuible a un exceso de ADN diana con respecto a la concentración de la sonda ARN de captura.

Ejemplo 12. Detección de ADN de caballo en lisados mitocondriales.

Se utilizaron los lisados mitocondriales obtenidos según el ejemplo 4 a partir de 3 g de carne de vacuno y de caballo, para comprobar si se podía prescindir de la extracción de ADNmt. Se prepararon varias diluciones de los lisados mitocondriales con solución bloqueante de caseína. Paralelamente se realizaron mediciones a partir del ADNmt extraído de la misma cantidad de carne. En la figura 6 se aprecia cómo el biosensor de la invención pudo discriminar entre carne de vacuno y carne de caballo sin necesidad de proceder a la extracción del ADNmt, empleando directamente lisados mitocondriales diluidos, obteniéndose los mejores resultados con la dilución 1:2 (volumen lisado mitocondrial/volumen total).

Ejemplo 13. Selectividad del biosensor de la invención.

Para analizar la selectividad de los biosensores de la invención se realizaron diluciones 1:1, en solución bloqueante de caseína, de lisados mitocondriales
5 obtenidos a partir de 3 g de carne de vacuno, pavo, cerdo, pollo y caballo. En la figura 7 se muestra cómo solo se obtuvo respuesta amperométrica significativa (diferenciada con respecto a la obtenida en ausencia de una secuencia diana de ADN, es decir, en el control negativo) cuando se utilizaron lisados mitocondriales preparados a partir de carne de caballo.

10

Ejemplo 14. Aplicabilidad del biosensor en la detección de adulteraciones fraudulentas.

El parámetro más importante para asegurar la aplicabilidad real del biosensor en la detección de adulteraciones de la carne de vacuno con carne de caballo, con fines
15 fraudulentos, es el límite de detección real de la carne de caballo en presencia de carne de vacuno que es capaz de alcanzar el biosensor de la invención.

Para analizar este parámetro se mezclaron diferentes porcentajes de carne de vacuno triturada con diferentes porcentajes de carne de caballo triturada como se describe en el ejemplo 3. Como se muestra en la figura 8, se puede diferenciar
20 claramente entre un 100% de carne de vacuno y muestras que contienen diferentes cantidades de carne de caballo, incluso cantidades tan pequeñas como el 0,5% (p/p), que fue la cantidad que estableció la Comisión Europea en su recomendación sobre un segundo plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de carne de vacuno, en marzo de 2014
25 (Diario Oficial de la Unión Europea L 95/64, 29.3.2014).

En este ejemplo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (con un nivel de confianza del 95%) entre las señales amperométricas detectadas por el biosensor de la invención en carne 100% vacuno y carne con un 99,5% de vacuno y
30 un 0,5% de caballo (figura 9a). Se comprobó la existencia de una dependencia lineal ($r = 0,999$) entre la corriente catódica medida y el porcentaje de carne de caballo utilizado en la mezcla de carnes en el intervalo de 1,0 a 10,0% (figura 9b), por lo que el biosensor de la invención no solo es útil en la detección de la adulteración sino
35 también en su cuantificación.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección y/o cuantificación de ADN de caballo en muestras aisladas que incluye:
- 5 a. – unir al menos una molécula de una sonda con una secuencia diana específica de ADN o de ARN a partículas magnéticas;
- b. - poner en contacto las partículas magnéticas del paso a. con la/s muestra/s en las que se desea detectar y/o cuantificar el ADN de caballo;
- c. - incubar las partículas magnéticas del paso b. con un anticuerpo detector, o un
10 fragmento de anticuerpo detector, específico antihomoduplex ADN/ADN o antiheteroduplex ARN/ADN;
- d. - incubar las partículas magnéticas del paso c. con una proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, conjugada con una molécula de generación y amplificación de la respuesta
15 electroquímica;
- e. – capturar las partículas magnéticas del paso d. sobre electrodos impresos de trabajo colocados en soportes magnéticos;
- donde la sonda del paso a. tiene una longitud de entre 15 y 144 pb y está comprendida en SEQ ID NO: 2, la secuencia inversa a SEQ ID NO: 2, la
20 transcripción a ARN de cualquiera de las dos anteriores, o secuencias con un 98% de identidad con cualquiera de las cuatro anteriores.
2. Método según la reivindicación 1 en el que las muestras del paso b. son muestras de ADN mitocondrial extraído.
- 25
3. Método según la reivindicación 1 en el que las muestras del paso b. son lisados mitocondriales sin extracción del ADN.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que los pasos c. y d. se realizan simultáneamente.
- 30
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que los pasos b. c y d se realizan simultáneamente.
- 35
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las partículas magnéticas son nanopartículas o micropartículas.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las partículas magnéticas tienen propiedades superparamagnéticas.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la unión de la secuencia diana específica de ADN o de ARN a las partículas magnéticas se realiza con:
- 5 - un primer elemento de unión con el que se modifican las partículas magnéticas: biotina, proteínas de unión a análogos de biotina, grupos COOH, grupos tosilo y/o secuencias específicas de ADN;
- 10 - un segundo elemento de unión de la sonda de ADN o de ARN a las partículas magnéticas modificadas: biotina, análogos de biotina, grupos amino y/o bases complementarias a las secuencias específicas de ADN.
9. Método según la reivindicación 8 en el que las proteínas de unión a análogos de biotina se seleccionan del grupo: estreptavidina, avidina, espiavidina, neutravidina, traptavidina y/o anticuerpos antibiotina.
- 15 9. Método según la reivindicación 8 en el que las proteínas de unión a análogos de biotina se seleccionan del grupo: estreptavidina, avidina, espiavidina, neutravidina, traptavidina y/o anticuerpos antibiotina.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9 en el que las secuencias específicas de ADN son secuencias de entre 4 y 30 adeninas (A) o entre 4 y 30 timinas (T).
- 20 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-9 en el que las secuencias específicas de ADN son secuencias de entre 4 y 30 adeninas (A) o entre 4 y 30 timinas (T).
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en el que los análogos de biotina se seleccionan del grupo: digoxigenina, biotinpropanol, moléculas de biotina marcadas con fluoresceína.
- 25 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en el que los análogos de biotina se seleccionan del grupo: digoxigenina, biotinpropanol, moléculas de biotina marcadas con fluoresceína.
12. Método según la reivindicación 8 en el que el primer elemento de unión es estreptavidina y el segundo elemento de unión es biotina.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, es la proteína G o la proteína A.
- 30 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, es la proteína G o la proteína A.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica es HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina.
- 35 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica es HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina.

15. Método según las reivindicaciones 13-14 en el que la proteína bacteriana es Prot A y la molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica es poli-HRP40.
- 5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la sonda está caracterizada por SEQ ID NO: 3 o por SEQ ID NO: 4.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el electrodo de trabajo está realizado con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, electrodos impresos, plata, mercurio, grafito, carbón vítreo, 10 nanotubos de carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro.
18. Método según la reivindicación 17 en el que el electrodo es un electrodo de 15 trabajo impreso de carbono.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el soporte magnético incluye un imán de neodimio.
- 20 20. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el soporte magnético incluye un imán embebido en la propia estructura del soporte magnético.
21. Kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas que incluye:
- 25 - partículas magnéticas modificadas con un primer elemento de unión al que se une al menos una molécula de una sonda de ADN o de ARN por medio de un segundo elemento de unión;
- un anticuerpo detector, o un fragmento de anticuerpo detector, específico antihomoduplex ADN/ADN o antiheteroduplex ARN/ADN;
- 30 - una proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, conjugada con una molécula de generación y amplificación de la respuesta electroquímica;
- y un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético;
- en el que la sonda tiene una longitud de entre 15 y 144 pb y está comprendida en 35 SEQ ID NO: 2, la secuencia inversa a SEQ ID NO: 2, la transcripción a ARN de cualquiera de las dos anteriores, o secuencias con un 98% de identidad con cualquiera de las cuatro anteriores.

22. Kit según la reivindicación 21 en el que las partículas magnéticas son nanopartículas o micropartículas.
- 5 23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-22 en el que las partículas magnéticas tienen propiedades superparamagnéticas.
24. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-23 en el que el primer elemento de unión con el que se modifican las partículas magnéticas es biotina, proteínas de unión a análogos de biotina, grupos COOH, grupos tosilo y/o secuencias específicas de ADN.
- 10 25. Kit según la reivindicación 24 en el que las proteínas de unión a análogos de biotina se seleccionan del grupo: estreptavidina, avidina, espiavidina, neutraavidina, traptavidina y/o anticuerpos antibiotina.
- 15 26. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 24-25 en el que las secuencias específicas de ADN son secuencias de entre 4 y 30 adeninas (A) o entre 4 y 30 timinas (T).
- 20 27. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-26 en el que el segundo elemento de unión de la sonda de ADN o de ARN a las partículas magnéticas modificadas es biotina, análogos de biotina, grupos amino y/o bases complementarias a las secuencias específicas de ADN.
- 25 28. Kit según la reivindicación 27 en el que los análogos de biotina se seleccionan del grupo: digoxigenina, biotinpropanol, moléculas de biotina marcadas con fluoresceína.
- 30 29. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-23 en el que el primer elemento de unión es estreptavidina y el segundo elemento de unión es biotina.
- 35 30. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-29 en el que la proteína bacteriana con capacidad de unión a la región Fc del anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, es la proteína G o la proteína A.

31. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-30 en el que la molécula de generación y amplificación de la señal es HRP, poli-HRP o fosfatasa alcalina.

5 32. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-31 en el que la sonda está caracterizada por SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

33. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-32 en el que el electrodo de trabajo está realizado con un material seleccionado del grupo: oro, carbono, platino, CD-trodos, electrodos impresos, plata, mercurio, grafito, carbón vítreo, nanotubos de
10 carbono, nanocables de oro, nanopartículas de oro, nanopartículas de óxido metálico, pasta de carbono, diamante y compuestos dopados con boro.

34. Kit según la reivindicación 33 en el que el electrodo es un electrodo impreso de carbono.

15

35. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21-34 en el que el soporte magnético incluye un imán de neodimio.

36. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 33-35 en el que el soporte magnético
20 incluye un imán embebido en la propia estructura del soporte magnético.

37. Kit para detectar y/o cuantificar la presencia de ADN de caballo en muestras aisladas que incluye:

25 - micropartículas magnéticas modificadas con estreptavidina a las que se une una sonda caracterizada por SEQ ID NO: 3 o 4 y modificada con biotina;

- un anticuerpo detector, o fragmento de anticuerpo detector, específico antiheteroduplex ARN/ADN;

- una proteína bacteriana Prot A conjugada con poli-HRP20, poli-HRP40 o poli-HRP80;

30 - y un electrodo impreso de trabajo sobre un soporte magnético que incluye un imán unido al soporte magnético o embebido en su estructura.

38. Uso del kit definido en las reivindicaciones 21-37 en la detección y/o cuantificación de la presencia de carne de caballo en mezclas de carne.

Fig. 1

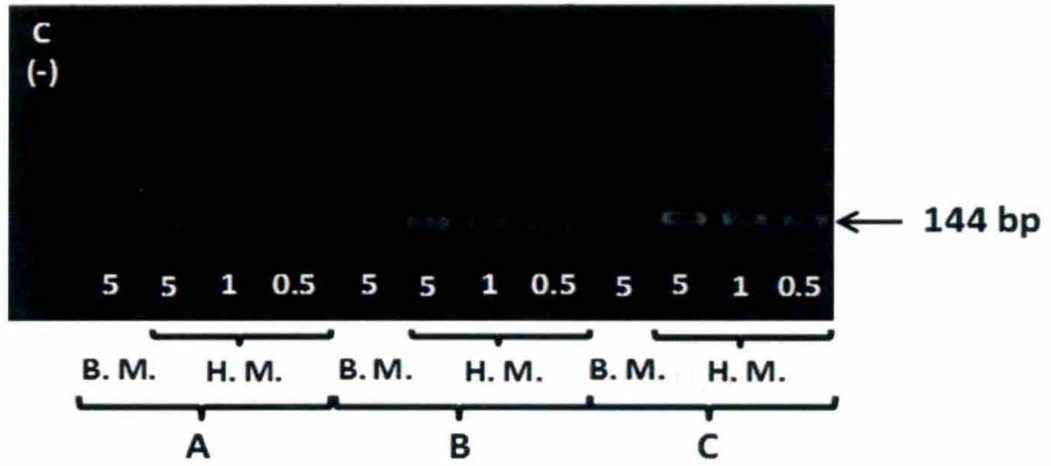


Fig. 2

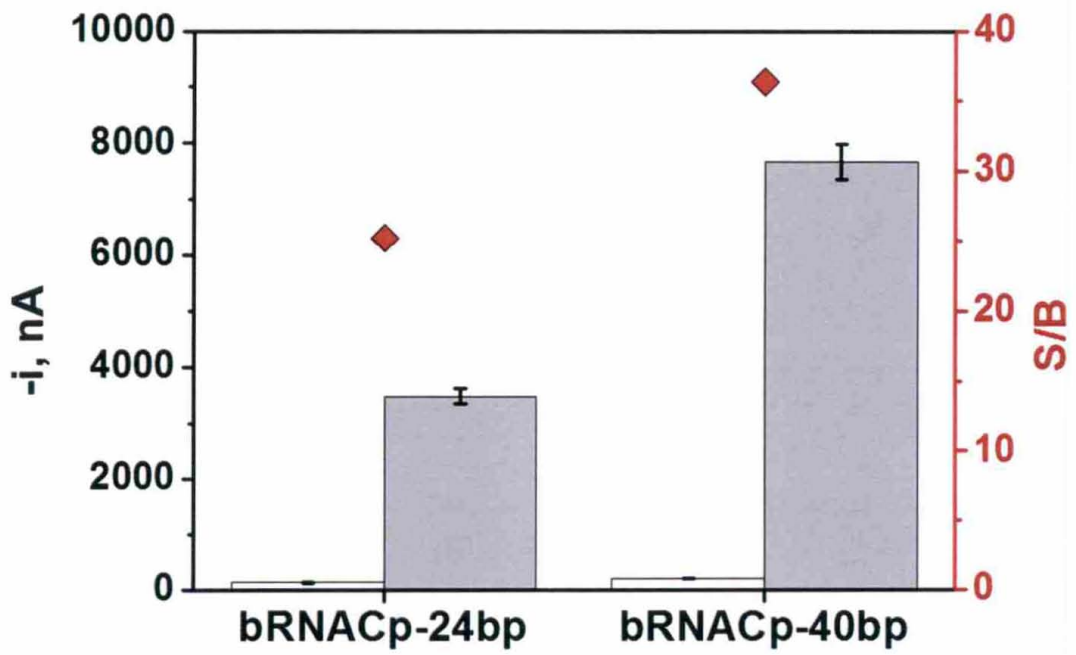


Fig. 3

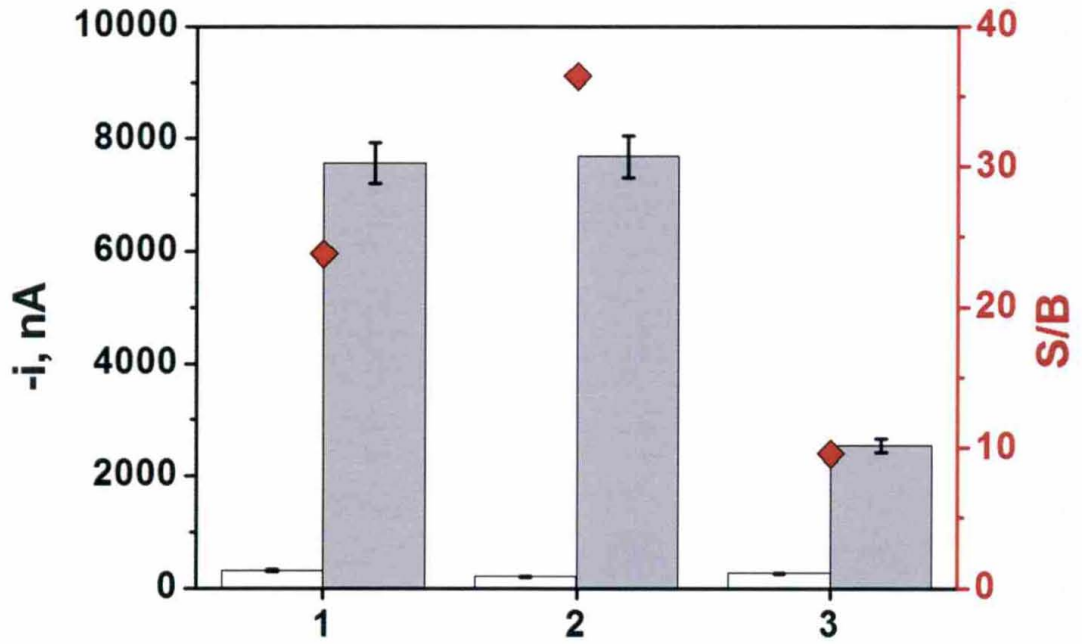
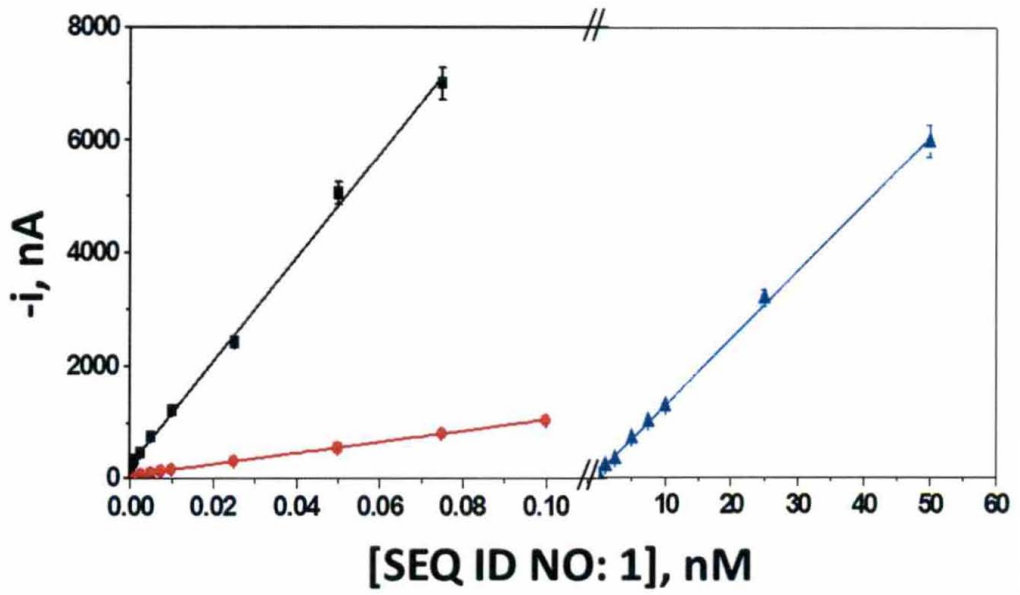


Fig. 4



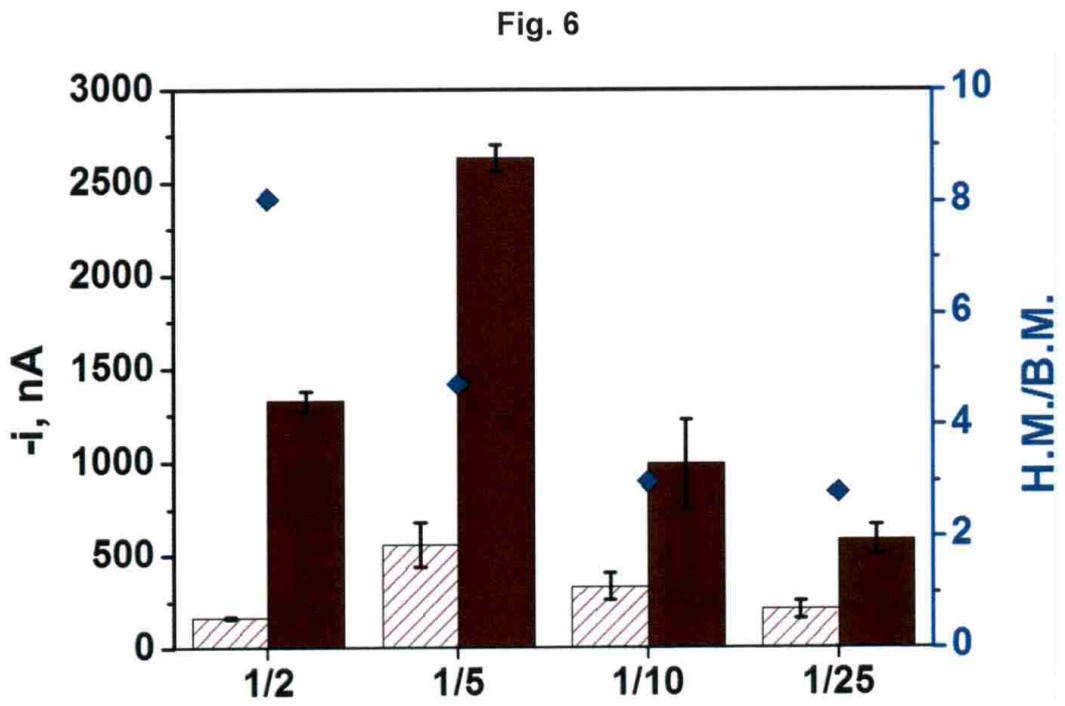
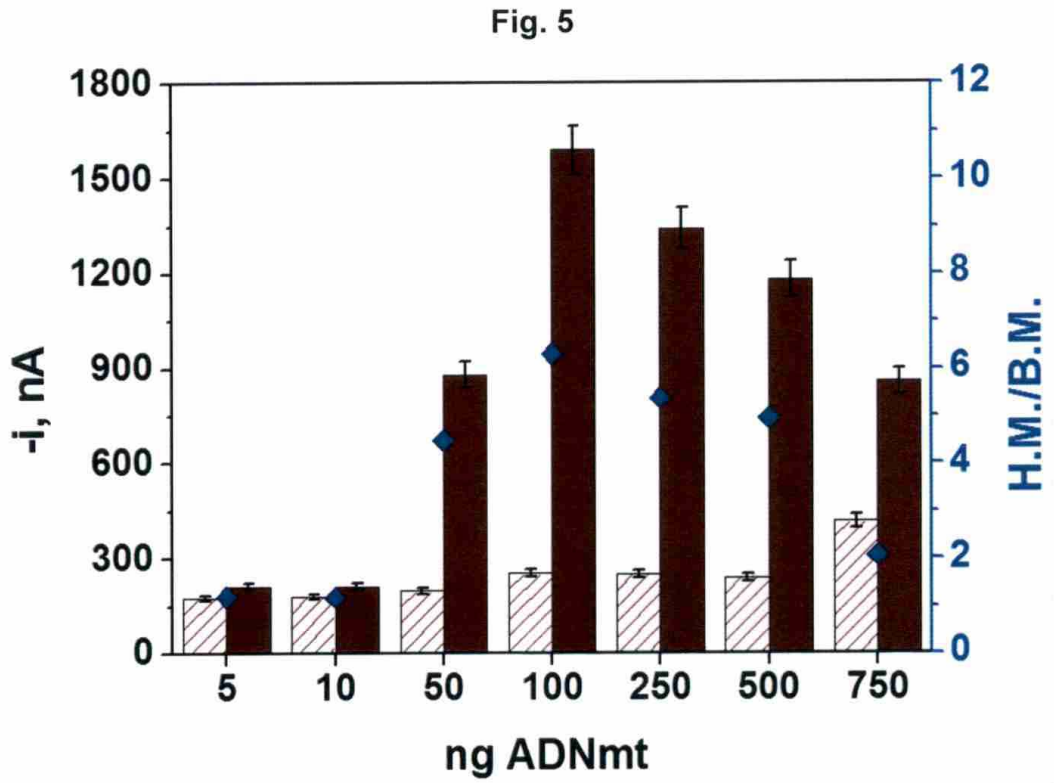


Fig. 7

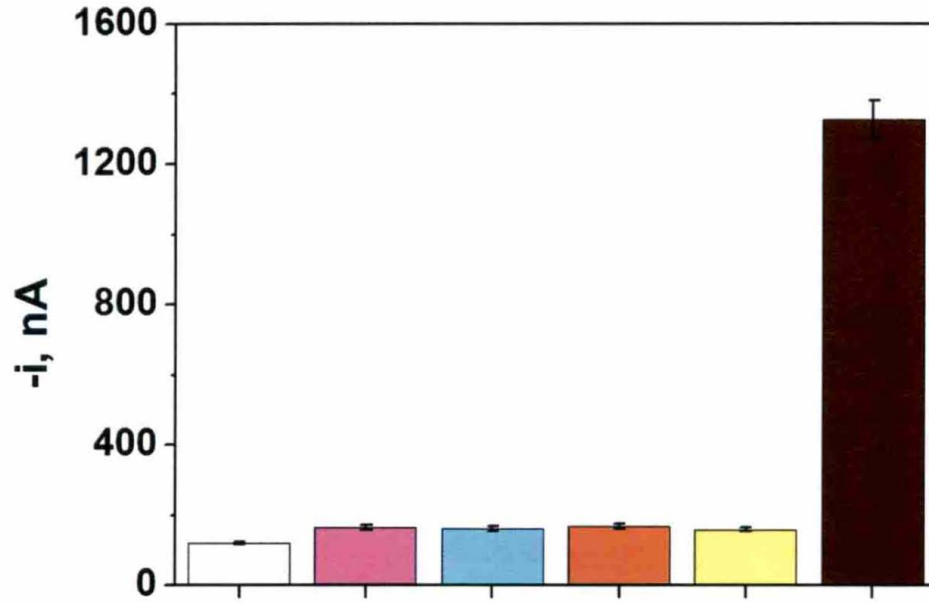


Fig. 8

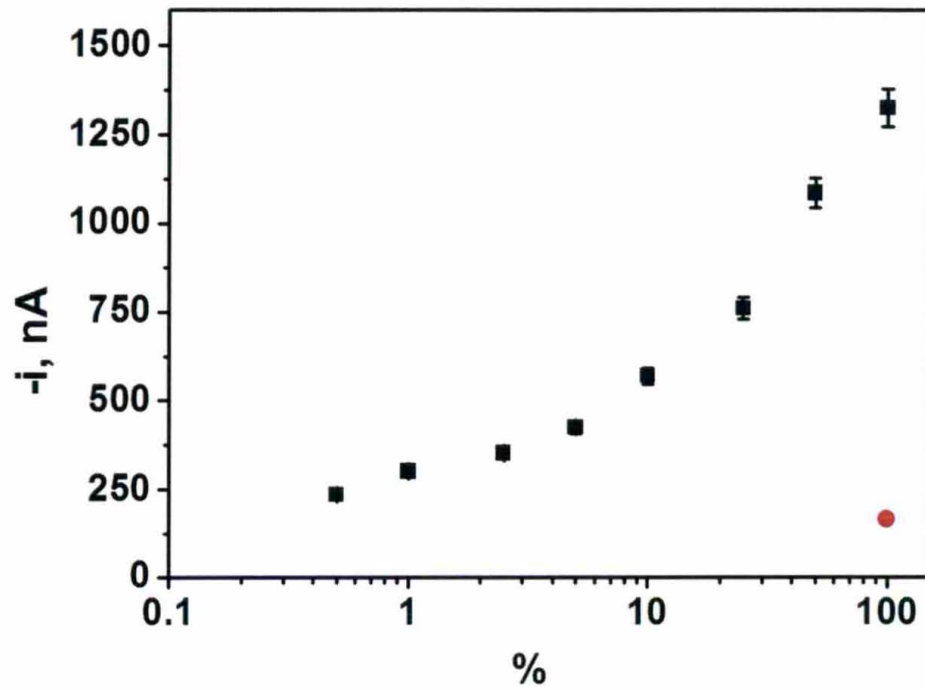


Fig. 9a

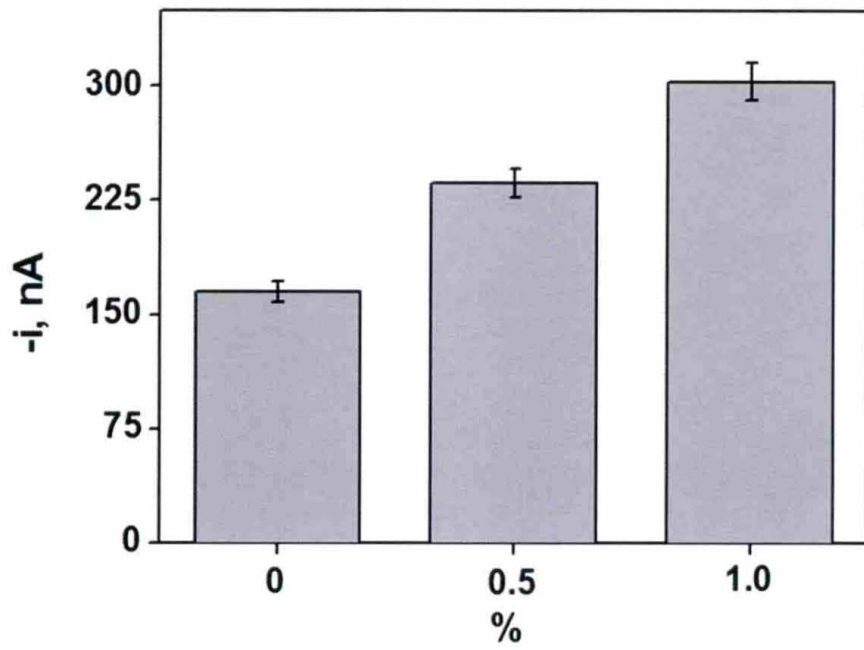
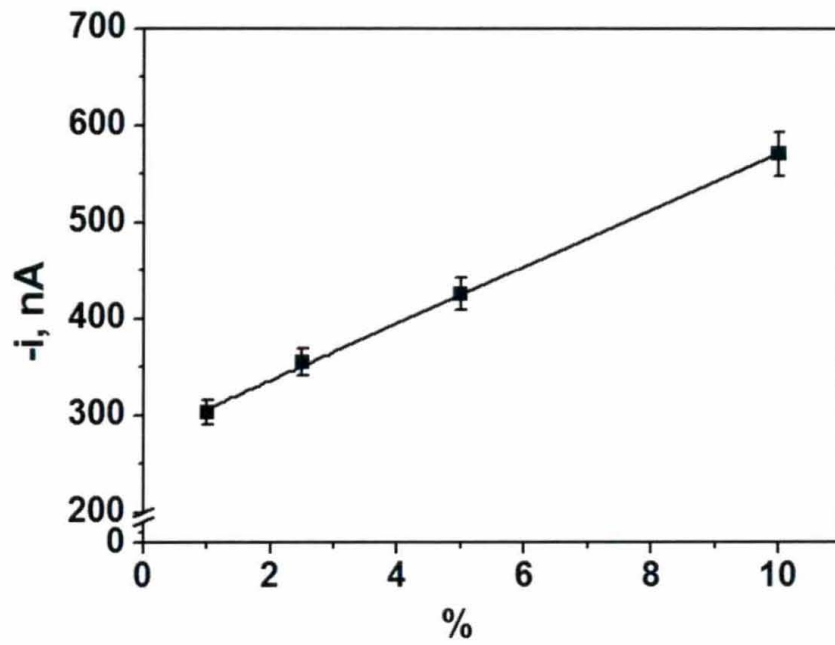


Fig. 9b





- ②① N.º solicitud: 201700642
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SINGH, V.P, PATHAK, V. NAYAK, N. K et al. Recent Developments in Meat Species Speciation- a review. Journal of Livestock Science (2014), Vol 5, páginas 49-64.(ISSN online 2277-6214)..	1-38
A	CHO, A.R., DONG.H.J, CHO. S. Meat Species Identification using Loop-mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Species-specific Mitochondrial DNA. Korean J Food Sci Anim Resour (2014), Vol 34, Nº 6, páginas 799-807.	1-38
A	MANE, B. G. MENDIRATTA, S. K., TIWARI, A .K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. Food Chemistry (2009), Vol 116, Nº 3, páginas 806-810.	1-38
A	ALI, M.E., HASHIM, U., MUSTAFA, S. et al. Nanobiosensor for Detection and Quantification of DNA Sequences in Degraded Mixed Meats. Journal of Nanomaterials (2011), Páginas 1-11.	1-38
A	TORRENTE-RODRÍGUEZ, R.M, RUIZ-VALDEPEÑAS, V., CAMPUZANO, S et al. Fast Electrochemical miRNAs Determination in Cancer Cells and Tumor Tissues with Antibody-Functionalized Magnetic Microcarriers. ACS Sens, (1/06/2106), Vol 1,Nº 7,páginas 896–903. .	1-38
A	SOTILLO, A., PEDRERO, M., DE PABLOS, M. et al Clinical evaluation of a disposable amperometric magneto-genosensor for the detection and identification of <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Journal of Microbiological methods (2014) . Vol 103, páginas 25-28.	1-38

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 29.09.2017	Examinador A. Barrios de la Fuente	Página 1/2
--	---------------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

G01N33/02 (2006.01)

G01N33/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPIAP, TCM, TXPE, TXPCN,TXPUS, TXPSP,TXPWOWEA BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE, ENA SEQUENCE RELEASE, ENA SEQUENCE UPDATES, ENA SEQUENCE PATENT, ENA SEQUENCE STANDARD, NR PATENTS DNAs LEVEL-1 AND LEVEL-2, INTERNET.