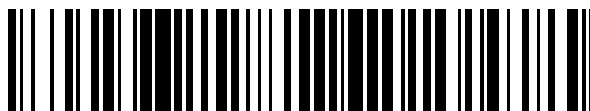


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 489**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014** **PCT/EP2014/078179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2015** **WO15097030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014** **E 14818949 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 3087197**

54 Título: **Métodos de detección de origen de especie de muestras**

30 Prioridad:

27.12.2013 EP 13199634

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

18.03.2019

73 Titular/es:

UNIVERSITE DE LIEGE (50.0%)

Avenue Pré-Aily 4

4031 Angleur, BE y

QUALITY PARTNER S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

DAUBE, GEORGES;

BURTEAU, SOPHIE;

NEZER, CARINE y

DELHALLE, LAURENT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 704 489 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

Métodos de detección de origen de especie de muestras

La invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere al campo de la caracterización del contenido de carne de cualquier muestra alimentaria basada en cualquier tecnología de secuenciación de alto rendimiento utilizada para secuenciar cualquier fragmento génico idéntico (genómico o mitocondrial) amplificado a partir de cebadores animales universales e identificado basándose en el contenido polimórfico altamente informativo en dichos cebadores comunes.

La invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere al campo de los métodos analíticos que se han desarrollado para identificar y cuantificar las especies animales más frecuentes presentes en carne picada, preparaciones cárnicas y productos cárnicos y para cuantificar la proporción de los mismos.

La identificación de especie es una preocupación importante debido a la creciente conciencia del consumidor sobre la composición de los alimentos y la necesidad de verificar las declaraciones del etiquetado. La carne picada, las preparaciones de carne y los productos cárnicos procesados son dianas susceptibles de etiquetado fraudulento debido al beneficio económico que resulta de comercializar carnes más económicas en sustitución parcial o total de carnes de alto valor. Se utilizan varios métodos analíticos para la autenticación de la carne y los productos cárnicos. Entre los métodos analíticos se incluyen la reacción en cadena de polimerasa, la cromatografía, la espectrometría de masas, la microscopía, la espectroscopía, la resonancia de espín electrónico y los ensayos enzimáticos. En la determinación de especies, el análisis del ADN y de proteínas son prácticas habituales.

Entre los métodos basados en el ADN, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una técnica eficaz que es altamente precisa y relativamente rápida. Los métodos de PCR cualitativa convencional presentan un rendimiento satisfactorio en la detección cualitativa de la especie de la carne. Sin embargo, ha surgido la necesidad de métodos que proporcionen resultados cuantitativos con la introducción de las obligaciones de etiquetado. Además, la cuantificación también resulta necesaria para la detección del adulterado intencionado de los productos cárnicos o la contaminación accidental en la línea de producción. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos mejorados para la determinación cuantitativa del origen u orígenes específicos de la carne y productos cárnicos.

La invención proporciona un método definido en las reivindicaciones adjuntas para determinar el origen u orígenes de especie del ADN en una muestra, que comprende llevar a cabo un análisis de las secuencias metagenómico de la muestra con el fin de identificar el ADN de las especies presentes y las proporciones relativas de las mismas. Después puede llevarse a cabo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) específica de especie y cuantificar una diana específica de especie a partir del ADN de las especies identificadas. En particular, la invención proporciona un método definido en las reivindicaciones adjuntas para determinar el origen u orígenes de especie del ADN en una muestra alimentaria, que comprende llevar a cabo un análisis de las secuencias metagenómico de la muestra alimentaria mediante secuenciación de alto rendimiento para identificar el ADN de por lo menos una especie, en el que el análisis metagenómico comprende la amplificación y secuenciación de una secuencia de ADN diana metagenómica que es parte del gen de miostatina (MSTN), seleccionando dicha secuencia de ADN diana metagenómico para permitir: i) la coamplificación de la secuencia de ADN diana metagenómico a partir de una pluralidad de especies utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados que comprende cebadores que comprenden o que consisten en la secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3, y ii) la identificación del origen de especie de cualquier ADN diana metagenómico amplificado basándose en su secuencia, en el que el método comprende la etapa de amplificar el ADN diana utilizando un conjunto de cebadores que comprende o que consiste en la secuencia de SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3.

Entre las tecnologías moleculares de nueva generación, el análisis metagenómico se está reconociendo como una herramienta potente. La metagenómica aplica un conjunto de tecnologías genómicas y herramientas bioinformáticas para acceder directamente al contenido genético de comunidades enteras de organismos. Esta tecnología se utiliza habitualmente para describir perfiles de comunidad microbiana de diversos ecosistemas, tales como mares, suelos, rumen, heces, aunque también para estudiar la compleja microfauna presente en productos alimentarios. La invención aplica la técnica de la metagenómica en el primer estadio de la identificación secuencial y estimación de la proporción de las especies animales en una muestra o de cuantificación del origen del ADN en una muestra. Preferiblemente, la secuencia de ADN diana metagenómica se secuencia mediante un procedimiento de secuenciación en paralelo masiva. En algunas realizaciones, el procedimiento de secuenciación en paralelo masiva se selecciona de secuenciación en emulsión y secuenciación en fase sólida. La secuencia diana de ADN metagenómica puede ser un gen cromosómico o mitocondrial conservado en todas las especies animales. El gen diana debe caracterizarse tanto con secuencias conservadas utilizables para el diseño de cebadores universales y con una secuencia dentro de cebador de nicho de conservación inferior en polimorfismos dentro de los diversos homólogos de la especie de interés, tal que la secuencia específica de la diana amplificada, entre las secuencias de cebador, puede utilizarse para identificar la especie de origen. Debido a que las mitocondrias de los mamíferos existen en múltiples copias en cada célula, podría utilizarse cualquier región del ADN mitocondrial (ADNmt) para la detección e identificación de rastros de ADN (ej.: la ausencia de carne de cerdo en el mercado Halal). El gen cromosómico presente en una copia en cada célula resulta adecuado para la identificación y estimación de la proporción relativa de especies en los productos cárnicos.

En el segundo estadio opcional del método definido en las reivindicaciones adjuntas de la invención, se utiliza la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) para cuantificar la cantidad de ADN de las especies identificadas en el primer estadio como presentes en la muestra. La PCR en tiempo real en los últimos años ha experimentado la mayor mejora de entre los métodos cuantitativos basados en PCR. En la PCR en tiempo real, se monitoriza la amplificación exponencial de ADN específico de diana a partir de una señal fluorescente incrementada. En el caso de que la especie bajo estudio se encuentre presente en la matriz, puede observarse una señal específica. Además de satisfacer la necesidad de determinación cuantitativa de las especies en la carne, esta técnica también ofrece otras ventajas, como una sensibilidad y especificidad más elevadas.

La PCR cuantitativa puede estar basada en la utilización de pigmentos intercalantes, o en la utilización de un cebador informador marcado y/o sonda. En algunas realizaciones de la invención, por tanto, se selecciona la etapa de qPCR de qPCR que utiliza un pigmento intercalante y qPCR que utiliza un cebador informador marcado o sonda. En realizaciones basadas en pigmentos fluorescentes intercalantes, el pigmento puede ser SYBRGreen o EvaGreen. Tales métodos requieren la máxima especificidad de secuencia debido al hecho de que estos tipos de pigmento se unen a todo el ADN de doble cadena presente, incluyendo cualesquiera productos de PCR no específicos y el complejo de cebador-dímero.

En otras realizaciones preferibles, el procedimiento de PCR cuantitativa en tiempo real para la identificación de especie se basa generalmente en la utilización de un cebador informador marcado o sonda. Preferiblemente, el cebador informador marcado o sonda es parte de un sistema informador fluorescente/desactivador u otro sistema informador de fluorescencia en el que la amplificación del ADN diana específico de especie resulta en una reducción o eliminación de la desactivación de la fluorescencia u otro incremento de la fluorescencia, dando como resultado una señal fluorescente detectable. Por ejemplo, una sonda fluorogénica TaqMan (también denominada sonda de hidrólisis en la presente memoria (la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa degrada la sonda que se ha hibridado al molde. La degradación de la sonda libera el fluoróforo del molde y rompe la estrecha proximidad al desactivador, reduciendo así el efecto desactivador y permitiendo la fluorescencia del fluoróforo)) puede utilizarse como el sistema informador. Este método utiliza un oligonucleótido adicional, que también se une específicamente a la secuencia de ADN diana durante la etapa de hibridación. Este oligonucleótido presenta unido tanto un pigmento fluorescente informador como un pigmento desactivador. La acumulación de productos de PCR específicos se detecta mediante hibridación y corte de una sonda fluorogénica doblemente marcada durante la reacción de amplificación.

Pueden utilizarse otros sistemas informadores alternativos. Por ejemplo, el sistema informador puede comprender una sonda baliza molecular, una pareja de sondas de hibridación dual, un sistema de cebador Amplifluor, un sistema de cebadores Scorpion, un sistema de encendido con la extensión o un sistema de cebadores QZyme. El experto en la materia conocerá otros sistemas adecuados y podrán utilizarse para proporcionar información de PCR en tiempo real cuantitativa.

Pueden utilizarse cualesquiera secuencias diana adecuadas para un estadio cualquiera o ambos estadios del procedimiento. Para que resulte adecuado para el estadio 1 del procedimiento (análisis metagenómico), la diana debe permitir la coamplificación a partir de una pluralidad de especies utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados. Preferiblemente, se utiliza una única pareja de cebadores (un cebador directo y un cebador inverso) para coamplificar la secuencia de ADN diana metagenómica de sustancialmente todas las especies de interés. Sin embargo, el procedimiento no se limita a la utilización de únicamente una sola pareja de cebadores. El análisis metagenómico puede mejorarse y expandirse en su alcance mediante la adición de múltiples cebadores directos y/o inversos que pueden permitir un abanico más amplio de secuencias específicas de especie que puedan amplificarse. También pueden utilizarse múltiples cebadores para garantizar que la eficiencia de amplificación es generalmente similar para todas las especies de interés a fin de eliminar o reducir la sobre-representación de una especie, posiblemente a expensas de otra, durante el procedimiento de amplificación.

La secuencia diana metagenómica preferiblemente es una secuencia que presenta el mismo número de copias por genoma en cada una de las especies de las que se sospecha su presencia en la muestra alimentaria, de manera que permita una determinación de las proporciones relativas de los diferentes ADN identificados mediante el análisis metagenómico.

El experto en la materia podrá determinar las parejas de cebadores apropiadas para el análisis metagenómico basándose en el examen de una alineación de secuencias de un gen homólogo compartido por las especies de interés. Pueden examinarse regiones altamente conservadas del gen de interés para la posibilidad de proporcionar un número relativamente pequeño de cebadores capaces de amplificar la diana a partir de un número elevado de especies. Preferiblemente un número pequeño de cebadores, por ejemplo 2 o 3 cebadores, podría resultar adecuado para amplificar una pluralidad de secuencias diana de, p.ej., por lo menos 12 o 13 o más especies. Los cebadores pueden incluir una o más bases nucleótidas degeneradas con el fin de incrementar el abanico de especies cuyo ADN diana puede amplificarse en el análisis metagenómico. Los cebadores también pueden modificarse mediante la adición de adaptadores o etiquetas, o secuencias universales para la utilización en la manipulación de productos de amplificación, incluyendo la secuenciación de los productos.

En el análisis metagenómico, tras la amplificación de las secuencias diana, los amplicones producidos de esta manera se secuencian con el fin de determinar el origen de especie. Un requisito adicional, por tanto, de la secuencia de ADN

diana metagenómica es que permite la identificación del origen de especie de cualquier ADN diana metagenómico amplificado basándose en su secuencia. Esto puede conseguirse proporcionando cebadores de PCR de regiones altamente conservadas (tal como se ha comentado anteriormente), que flanquean regiones de menor conservación de entre los diversos homólogos de la especie de interés, tal que la secuencia específica de la diana amplificada, entre las secuencias de cebador, pueda utilizarse para identificar la especie de origen.

Identificación de especies animales mediante tecnología NGS utilizando un gen cromosómico:

Los inventores han encontrado que el gen de miostatina (MSTN) es un gen adecuado para la utilización en el procedimiento de la invención, en particular en la identificación y cuantificación de especies en productos cárnicos. El gen MSTN codifica la proteína miostatina (también conocida como factor de diferenciación del crecimiento 8, o GDF-8). La miostatina es un factor de diferenciación del crecimiento secretado que es un miembro de la familia de la proteína TGF-beta que inhibe la diferenciación y crecimiento muscular en el proceso conocido como miogénesis. El gen se clasifica como un gen de mantenimiento, que es un grupo de genes codificantes principalmente de proteínas esenciales en la función celular básica. Estos genes incluyen una zona conservada útil para el diseño de cebadores conservados y una zona variable para la identificación de la especie y presente en una sola copia en el genoma, un elemento importante para el método de cuantificación.

En todas las realizaciones, el gen de miostatina se utiliza en la invención definida en las reivindicaciones adjuntas para identificar y cuantificar el ADN de por lo menos una especie de un género seleccionado de *Sus*, *Gallus*, *Bos*, *Ovis*, *Equus*, *Meleagris*, *Felis*, *Canis canis*, *capreolus capreolus*, *O.cuniculus*, *roe deer*, *Rabbit*, *Kangaro*, *Rattus rattus*, *mus musculus*, *Capra*, *Antilocapra*, *Cervus*, *Anas*, *Anser* y *Coturnix*, por ejemplo, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Bos Taurus*, *Ovis aries*, *Equus caballus*, *Meleagris gallopavo*, *Felis catus*, *Capra hircus*, *Antilocapra americana*, *Cervus elaphus*, *Anas platyrhyncho*, *Anser anser* y *Coturnix chinensi*. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN diana metagenómica es, por tanto, del gen MSTN. Preferiblemente, la secuencia de ADN diana metagenómica se amplifica mediante un conjunto de cebadores conservados que comprende por lo menos un cebador que comprende la secuencia SEQ ID nº 1, la SEQ ID nº 2, y un cebador que comprende la secuencia SEQ ID nº 3. En algunas realizaciones, la secuencia de ADN diana metagenómica se amplifica mediante un conjunto de cebadores conservados que comprende un cebador que comprende la secuencia SEQ ID nº 1, y un cebador que comprende la secuencia SEQ ID nº 2, y un cebador que comprende la secuencia SEQ ID nº 3. En algunas realizaciones, los cebadores consisten en las secuencias SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3. En algunas realizaciones, los cebadores que presentan o comprenden las secuencias SEQ ID nº 1, 2 o 3 se modifican adicionalmente mediante la adición de adaptadores, etiquetas o secuencias universales, dependiendo de la tecnología NGS utilizada.

En algunas realizaciones, el conjunto de cebadores para la amplificación del ADN diana metagenómico comprende un conjunto de cebadores directos que presenta la secuencias SEQ ID nº 4 y 5 y un conjunto de cebadores inversos con las secuencias SEQ ID nº 6 a 13.

El gen MSTN también resulta adecuado para la utilización en el segundo estadio opcional del procedimiento de la invención, que es el estadio de qPCR. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la secuencia de ADN diana específica de especie se amplifica mediante un conjunto de cebadores y el amplicón resultante se detecta mediante una sonda de hibridación marcada, seleccionando los cebadores y sondas de los siguientes:

a) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 17 y 18 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 19 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de cerdo (*Sus scrofa*), o

b) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 20 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 21 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pollo (*Gallus gallus*), o

c) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 22 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 23 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de vaca (*Bos taurus*), o

d) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 24 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 25 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de oveja (*Ovis aries*), o

e) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 26 y 27 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 28 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de caballo (*Equus caballus*), o

f) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 29 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 30 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pavo (*Meleagris gallopavo*), o

g) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 y/o 15 y 16 y una sonda que comprende

o que consiste en la secuencia SEQ ID nº 31 o 32 para la cuantificación de ADN procedente de todas las especies en la muestra.

Preferiblemente, los cebadores y sondas consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 a 32, respectivamente.

5 En algunas realizaciones, los cebadores directos seleccionados para las diversas especies pueden incluir cebadores con alguna degeneración y/o pueden incluir una mezcla de cebadores. Convenientemente, para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pollo, vaca, oveja o pavo, el cebador directo indicado anteriormente puede sustituirse por una mezcla de cebadores que presentan las secuencias SEQ ID nº 14 y 15.

10 En realizaciones preferentes, la cuantificación de secuencias de ADN diana específicas de especie se compara con una secuencia diana de control o referencia. Preferiblemente, la secuencia diana de control o referencia es parte del mismo gen que la secuencia diana específica de especie. En algunas realizaciones, por tanto, una secuencia diana de control o referencia es parte de la secuencia del gen MSTN. En algunas realizaciones, la secuencia diana de control o referencia se coamplifica con la secuencia diana específica de especie y se detecta en tiempo real (qPCR). En algunas realizaciones, se amplifica una secuencia diana de control o referencia utilizando un conjunto de cebadores que comprende o que consiste en las secuencias SEQ ID nº 14, 15 y 16, y se detecta utilizando una sonda que
15 comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID nº 31 o SEQ ID nº 32.

20 En otro aspecto, la invención proporciona la utilización definida en las reivindicaciones adjuntas de los cebadores tal como se ha comentado anteriormente (que comprenden o consisten en la secuencia SEQ ID nº 1, 2 y 3) con los cebadores y sondas también comentados en la presente memoria (que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 a 32) para la identificación metagenómica secuencial y determinación de las proporciones relativas y cuantificación específica de especie del ADN en una muestra alimentaria, seleccionando los cebadores y sondas específicos de especie utilizados para la cuantificación basándose en la identificación metagenómica del ADN específico presente en la muestra alimentaria. Preferiblemente la muestra es una muestra de carne.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit definido en las reivindicaciones adjuntas para la identificación metagenómica del ADN presente en una muestra alimentaria,, que comprende un conjunto de cebadores para la identificación metagenómica de una secuencia diana metagenómica en el gen de miostatina, seleccionando dicha secuencia diana metagenómica para permitir: i) la coamplificación de la secuencia de ADN diana metagenómica a partir de una pluralidad de especies utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados que comprenden cebadores que comprenden o consisten en la secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3, ii) la identificación del origen de especie de cualquier ADN diana metagenómico amplificado basándose en su secuencia, y
30 opcionalmente iii) las proporciones relativas de los diferentes ADN identificados. En algunas realizaciones, la secuencia diana metagenómica se selecciona para permitir la amplificación del ADN de entre por lo menos 12 o 13 especies diferentes utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados. En algunas realizaciones, el conjunto de cebadores comunes conservados incluye no más de tres cebadores, por ejemplo dos o tres cebadores.

35 El conjunto de cebadores del kit comprende cebadores que comprenden la secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2, y un cebador que comprende la secuencia SEQ ID nº 3. En algunas realizaciones, el conjunto de cebadores consiste en tres cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3, respectivamente. Preferiblemente, los cebadores consisten en las secuencias SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3. Puede adaptarse uno o más de los cebadores mediante la adición de un adaptador, etiqueta o secuencia universal. La invención proporciona además un kit definido en las reivindicaciones adjuntas para el análisis de PCR cuantitativa de una
40 secuencia diana específica de especie en una muestra alimentaria, comprendiendo dicho kit un conjunto de cebadores y sondas para la amplificación y la detección en tiempo real de una secuencia del gen de miostatina, seleccionando dicha secuencia para permitir la amplificación y/o detección específica de especie. En algunas realizaciones, la amplificación y/o detección específica de secuencia puede distinguir entre especies de un género seleccionado de
45 *Sus*, *Gallus*, *Bos*, *Ovis*, *Equus*, *Meleagris*, *Felis*, *Capra*, *Antilocapra*, *Cervus*, *Anas*, *Anser* and *Coturnix*, por ejemplo, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Bos Taurus*, *Ovis aries*, *Equus caballus*, *Meleagris gallopavo*, *Felis catus*, *Capra hircus*, *Antilocapra americana*, *Cervus elaphus*, *Anas platyrhyncho*, *Anser anser* y *Coturnix chinensis*.

En realizaciones preferentes, el conjunto de cebadores y sondas se selecciona de por lo menos uno de

50 a) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 17 y 18 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 19 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de cerdo (*Sus scrofa*), o

b) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 20 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 21 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pollo (*Gallus gallus*), o

55 c) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 22 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 23 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de vaca (*Bos taurus*), o

d) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 24 y 16 y una sonda que comprende o

consiste en la secuencia SEQ ID nº 25 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de oveja (*Ovis aries*), o

e) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 26 y 27 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 28 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de caballo (*Equus caballus*), o

f) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 29 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 30 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pavo (*Meleagris gallopavo*), o

g) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 y/o 15 y 16 y una sonda que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID nº 31 o 32 para la cuantificación de ADN procedente de todas las especies en la muestra.

En algunas realizaciones del kit, los cebadores que presentan las secuencias SEQ ID nº 20, 22, 24 y/o 29 pueden sustituirse por cebadores que comprenden o que consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 y 15.

En algunas realizaciones, los kits contienen además una sonda que presenta una secuencia SEQ ID nº 31 o SEQ ID nº 32 que actúa como sonda para una secuencia de control o referencia en el gen MSTN.

La invención proporciona además un kit definido en las reivindicaciones que presenta algunas o todas las características indicadas anteriormente para el análisis metagenómico y que presenta además algunas o todas las características indicadas anteriormente para el análisis de qPCR. Opcionalmente, el kit puede comprender además cualquier reactivo adecuado para la utilización en las etapas metagenómicas o de qPCR del procedimiento de la invención.

A continuación, se describe en mayor detalle la invención en referencia a los ejemplos y figuras siguientes, en las que:

La figura 1 muestra una alineación del exón1 de miostatina de 12 especies de mamífero y ave (frecuentemente observadas en carne y productos cárnicos).

La figura 2 muestra el sitio de unión de cebadores y sondas diseñados en el exón 1 de la miostatina para cerdo, vaca, caballo, oveja, pollo y pavo. (1) representa el cebador directo; (3): cebador inverso; (2) sonda Taqman.

La figura 3 muestra una curva de amplificación (A) y la regresión lineal (B) de la detección mediante PCR en tiempo real para vaca.

La figura 4 muestra el análisis metagenómico de muestras de carne.

La figura 5 muestra la proporción relativa de composición de mamíferos y aves en 20 mezclas de ADN utilizando la miostatina como gen diana. La tabla, posteriormente, incluye todas las secuencias analizadas e identificadas como pertenecientes a una de las 8 especies animales (todos los números <100 no son representativos). Estos resultados no se corrigen para el tamaño del genoma, explicando la diferencia respecto al 50-50% o 25-25-25-25% esperado de diferentes especies.

La figura 6 muestra las proporciones relativas de 14 mamíferos y aves identificados mediante secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés).

Identificación de especies animales mediante tecnología NGS utilizando genes mitocondriales.

La codificación de genes mitocondriales para el ARN ribosómico 12S es conocido por su impacto en la taxonomía de los eucariotas superiores. Entre estos genes se incluyen zonas conservadas útiles para el diseño de cebadores conservados y zonas variables requeridas para la identificación de especies. Dentro de la célula eucariótica superior, el número de mitocondrias varía entre 10 y 1.000 unidades. Este gen diana debe seleccionarse para detectar e identificar rastros minúsculos de ADN de especies animales.

Materiales y métodos

Aislamiento de ADN

Se homogeneizaron veinticinco gramos de muestra de carne o producto cárnico durante 1 minuto en 225 ml en una bolsa Tempo (bioMerieux Basingstoke, Inglaterra, ref. nº 80015) con agua fisiológica estéril utilizando un aparato Stomacher. A continuación, se utilizaron 1,5 ml de la suspensión para la extracción del ADN genómico total utilizando un kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Crawley, Reino Unido). Se evaluaron las concentraciones de ADN mediante fluorimetría vs. cuantificación del ADN utilizando PicoGreen.

Análisis metagenómico utilizando el gen MSTN

Diseño de cebadores conservados para pirosecuenciación.

La secuencia del exón 1 de la miostatina de 12 especies frecuentemente presentes en productos cárnicos (*Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Equus caballus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Anas platyrhynchos*, *Anser anser* y *Coturnix chinensis*, *Cervus elaphus*, *Antilocapra americana*), se alinearon para comparar la zona conservada que se utiliza para el diseño de cebadores conservados (fig. 1). Se diseñaron 3 cebadores para amplificar un fragmento de PCR de 313 bases (MSTN-E1-UP1: AGTCTATGTTTATATTTACCT (SEQ ID nº 1), MSTN-E1-UP2: AATCTYTGTTTATATTTACCT (SEQ ID nº 2), MSTN-E1- DN: TCATCRTCCTTCCAARGAGCC (SEQ ID nº 3). El fragmento amplificado mostraba una diversidad de secuencias suficiente para identificar las especies mediante secuenciación. El diseño del oligonucleótido incluía adaptadores de secuenciación Titanium A o B de 454 Life Sciences (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Bélgica) e identificadores multiplex (MID, por sus siglas en inglés) fusionados con el extremo 5' del cebador inverso.

10 ARN 12S ribosómico:

Se alinearon las secuencias del ARN 12S ribosómico de 13 especies frecuentes presentes en productos cárnicos para diseñar cebadores conservados (fig. 2). Se diseñaron 3 cebadores para amplificar un fragmento de PCR de 514 bases (NGS12S-FW1:

5'-AYACCGCCCGTCACCCTC-3';

15 NGS12S-REV15'-TWGGCTTTTCACCTCTAC - 3'; NGS12S-REV2: 5'- TWGGCATGTCACCTCTAC - 3')

	CEBADORES DIRECTOS	CEBADORES INVERSOS
<i>Equus caballus</i>	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAACGATGA
<i>Felis catus</i>	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAACGATGA
BT1	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGCAAGGGAACGATGA
BT2	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGCAAGGGAACGATGA
<i>Capra hircus</i>	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAATGATGA
<i>Canis lupus familiaris</i>	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAATGATGA
SS-Pietrain	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAAGATGA
SS-LW	ACACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAAGATGA
<i>Gallus gallus</i> 1	ATACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGCAAGGGAAGATGA
<i>Gallus gallus</i> 2	ATACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGCAAGGGAAGATGA
<i>Meleagris gallopavo</i>	ATACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAAGATGA
<i>Anser anser</i>	ATACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAAGATGA
<i>Anas platyrhynchos</i>	ATACCGCCCGTCACCCTC	GTACCGTAAGGGAAGATGA

Secuencias conservadas observadas y utilizadas para el diseño de cebadores comunes tras la alineación de secuencias de ARN 12S ribosómico de 13 especies frecuentes de mamífero y ave.

20 Los 2 fragmentos amplificados mostraban una diversidad de secuencias suficiente para identificar las especies mediante secuenciación. El diseño del oligonucleótido incluía adaptadores de secuenciación Titanium A o B de 454 Life Sciences (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Bélgica) e identificadores multiplex (MID, por sus siglas en inglés) fusionados con el extremo 5' del cebador inverso. Estos amplicones pueden utilizarse con o sin tecnología NGS.

25 A continuación, se proporciona un conjunto completo de cebadores diseñado para la secuenciación de 454 Life Sciences:

Cebador de fusión directo (adaptador B) - (MSTN-E1-UP)

MSTNE1-UP1:5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGAGTCTATGTTTATATTTACCT-3' (SEQ ID nº 4)

MSTNE1-UP2:5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGAATCTYTGTTTATATTTACCT-3' (SEQ ID nº 5)

Cebador de fusión inverso: (adaptador A) -Key-MID- (MSTN-E1-DN)

MSTNE1-DN-MID130 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACTGCACTCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 6)

MSTNE1-DN-MID101 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCGCAGGCTCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 7)

5 MSTNE1-DN-UM102 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACATCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 8)

MSTNE1-DN-UM103 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGCACTCTCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 9)

10 MSTNE1-DN-UM104 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGTAGTCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 10)

MSTNE1-DN-UM105 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACACGTCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 11)

MSTNE1-DN-UM106 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATATCGCGAGTCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 12)

15 MSTNE1-DN-UM107 :5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCCACTCAGCGTGTCTCTATCATCRTCTTCCAARGAGCC-3 (SEQ ID nº 13)

Estos amplicones pueden utilizarse con o sin tecnología NGS.

Para el gen de ARN 12S ribosómico:

Cebador de fusión directo: (adaptador B)-key-MID-(NGS12S-FW1)

20 NGS12S-FW MID 100:

5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACTGCACAYACCGCCCGTCAC
CCTC -3'

NGS12S-FW MID101:

5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCGCGCGCAYACCGCCCGTCAC
CCTC -3'

25 NGS12S-FW

MID102: 5'-
CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCTCTATCAYACCGCCCGTCAC
CCTC -3'

Cebador de fusión inverso: (adaptador A)-key-(NGS12S-REV1)

30 NGS12S-REV1.1: 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCGAGTCTCAGTWGGCTTTTCACCTCTAC-3'

NGS12S-REV1.2: 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCGAGTCTCAGTWGGCATGTCACCTCTAC-3'

NGS12S-REV1.3: 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCGAGTCTCAGTWGGCWTCTACCTCTA-3'

Estos amplicones pueden utilizarse con o sin tecnología NGS.

Construcción de biblioteca del gen MSTN y pirosecuenciación

35 La mezcla de amplificación contenía 5 U de polimerasa FastStart High Fidelity (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Bélgica), tampón 1x de reacción enzimática, dNTP 200 µM (Eurogentec, Liege, Bélgica), 0,2 µM de cada cebador y 100 ng de ADN genómico en un volumen de 25 µl. Las condiciones de termociclado consistían en una desnaturalización a 94°C durante 10 min seguido de 25 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, 72°C durante 1 min y una etapa final de elongación de 7 min a 72°C. Estas amplificaciones se llevaron a cabo en un aparato de gradiente de sistema Ep Master (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Los productos de PCR de aproximadamente 313 pb se comprobaron mediante electroforesis en gel y se purificaron utilizando el kit AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, EE.UU.) para eliminar los amplicones más cortos de 100 pb. Se agruparon cantidades iguales de cada uno de los

40

productos de PCR y posteriormente se amplificaron mediante PCR en emulsión antes de la secuenciación. La pirosecuenciación se llevó a cabo con el secuenciador Roche 454 GS Junior (Roche, Basel, Suiza).

Análisis bioinformático

- 5 Se llevó a cabo el procesamiento de imágenes y datos para la secuenciación de amplicones utilizando el paquete de software Genome Sequencer FLX System 2.3 (Roche, Basel, Suiza). Se utilizó el programa Mothur para la primera parte del análisis de las secuencias (Schloss et al., 2009). Se descartaron las secuencias más cortas. Las secuencias con bases ambiguas o los homopolímeros de más de 10 nucleótidos y con una puntuación media de calidad inferior a 25 se eliminaron junto con las secuencias de etiqueta y de cebador. Se asignaron las secuencias de muestras multiplexadas basándose en la presencia de los códigos de barras únicos asignados a cada muestra. Se preparó una matriz de distancias (distancia=0,01) y se agruparon las secuencias en unidades taxonómicas operativas (UTO). Se compararon las secuencias representativas de cada UTO con la base de datos de NCBI utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLASTN), una base de datos privada de secuencias del laboratorio de los inventores.

Las secuencias del gen de miostatina de Genbank eran:

- 15
- 5178958 ref |NM_21445.2 miostatina de *Sus scrofa* (MSTN), ARNm
 - 241897522 gb GQ184147.1 ARNm de miostatina de *Bos taurus*, cds completo
 - 4782570 ref |NM_001001461.1 miostatina de *Gallus gallus* (MSTN), ARNm
 - 12652492 ref |NM_001081817.1 miostatina de *Equus caballus* (MSTN), ARNm
 - 57164246 ref |NM_001009428.1 miostatina de *Ovis aries* (MSTN), ARNm
- 20
- 289600017 gb GQ246166.1 precursor de miostatina de *Capra hircus*, ARNm
 - 17064128 gb AF440861.1 ARNm de miostatina (MSTN) de *Anas platyrhynchos*
 - 1706410 gb AF440862.1 ARNm de miostatina (MSTN) de *Anser anser*
 - 14984905 gb EF62955.1 ARNm de miostatina de *Cervus elaphus xanthopygus*
 - 482746 gb AY62909.1 ARNm de miostatina de *Antilocapra americana*
- 25
- 1706414 gb AF440864.1 ARNm de miostatina (MSTN) de *Coturnix chinensis*
 - 512867089: 168-1181 miostatina (mstn) de *Xenopus (Silurana) tropicalis*, ARNm
 - 410969071 ref XM_00990972.1 miostatina (MSTN) de *Felis catus*, ARNm

Las secuencias mostradas en el listado de secuencias numeradas 80 a 93 incluyen secuencias de miostatina de diversos animales de Genbank.

- 30 Las secuencias mostradas en el listado de secuencias numeradas 94 a 103 incluyen secuencias de 12S mitocondrial de diversos animales de Genbank.

Cuantificación mediante qPCR utilizando el gen MSTN

Cebadores y sondas oligonucleótidos

- 35 Se desarrolló un ensayo de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) basado en TaqMan para cuantificar 6 especies frecuentes presentes en productos cárnicos (*Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Equus caballus*, *Ovis aries* y *Meleagris gallopavo*). Mediante la alineación de la secuencia de ADN del exón 1 de miostatina de estas especies según la base de datos del NCBI, se diseñaron cebadores directos e inversos y sondas Taqman para cada región específica de especie de carne (fig. 2). En la Tabla 1 se muestra la lista de estos cebadores y sondas.

Tabla 1: secuencias de cebadores y sondas utilizados en el presente estudio

		secuencia
cerdo	cebador directo	5'-CTGATTGTTGCTGGTCCC-3'
	cebador inverso	5'-GTTTCCGTCGTAGCGTGA-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-TGTAATGCATGTATGTGGAGACAAA-(BHQ)-3'
pollo	cebador directo	5'-GCAGCAGTCTATGTTTATATTACCT3'
	cebador inverso	5'-TCATCRTCTTCCAARGAGCC-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-TTCATGCAGATCGCRGTTGATCC-(BHQ)-3'
vaca	cebador directo	5'-ACTGCAAATCTCTGTTTATATTACCT-3'
	cebador inverso	5'-TCATCRTCTTCCAARGAGCC-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-TGTTTGTGGAGGGAACACTACATCCTC-(BHQ)-3'
oveja	cebador directo	5'-ACTGCAAATCTTTGTTTATATTACCT-3'
	cebador inverso	5'-TCATCRTCTTCCAARGAGCC-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-CATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAACCT-(BHQ)-3'
caballo	cebador directo	5'-GCAAATCTCTGTTTATATTACCTGTTTG-3'
	cebador inverso	5'-GGTAATGATTGTTTCCGTCGTC-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-TTCTTGCTGGTCCAGTGGATCTAA-(BHQ)-3'
pavo	cebador directo	5'-GCTAGCAGTCTATGTTTATATTACCT-3'
	cebador inverso	5'-TCATCRTCTTCCAARGAGCC-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-TGCAGATTTTATGTTTCATCCGGT-(BHQ)-3'
control normalizador	cebador directo	5'-GCTAGCAGTCTATGTTTATATTACCT-3'
	cebador inverso	5'-TCATCRTCTTCCAARGAGCC-3'
	sonda TaqMan	5'-(FAM)-GGAAGTATTGATCA-(BHQ)-LNA-3'

Las secuencias en la Tabla 1 presentan las SEQ ID nº siguientes:

- 5 Cebador directo de cerdo: SEQ ID nº 17. Cebador inverso de cerdo: SEQ ID nº 18. Sonda Taqman de cerdo: SEQ ID nº 19.
- Cebador directo de pollo: SEQ ID nº 20. Cebador inverso de pollo: SEQ ID nº 16. Sonda Taqman de pollo: SEQ ID nº 21.
- Cebador directo de vaca: SEQ ID nº 22. Cebador inverso de vaca: SEQ ID nº 16. Sonda Taqman de vaca: SEQ ID nº 23.
- 10 Cebador directo de oveja: SEQ ID nº 24. Cebador inverso de oveja: SEQ ID nº 16. Sonda Taqman de oveja: SEQ ID nº 25.
- Cebador directo de caballo: SEQ ID nº 26. Cebador inverso de caballo: SEQ ID nº 27. Cebador Taqman de caballo: SEQ ID nº 28.
- 15 Cebador directo de pavo: SEQ ID nº 29. Cebador inverso de pavo: SEQ ID nº 30. Sonda Taqman de pavo: SEQ ID nº 31.
- Cebador directo normalizador: SEQ ID nº 14. Cebador inverso normalizador: SEQ ID nº 16.
- Sonda Taqman normalizadora: SEQ ID nº 31. Una sonda Taqman normalizadora adicional que puede utilizarse es: FAM-AGTGGAGGAGCYTTGGGYAAAAG-BHQ (SEQ ID nº 32)

Los cebadores directos para pollo, vaca, oveja y pavo indicados anteriormente pueden sustituirse por una mezcla de los dos cebadores a continuación:

GCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCT (SEQ ID nº 14)

ACTGCAATCTYTGTTTATATTTACCT (SEQ ID nº 15).

5

Protocolo de PCR convencional

Se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando el sistema LightCycler 480 (Roche, Basel, Suiza). Las mezclas de reacción de PCR se introdujeron en un volumen final de 12 µl que contenía 6 µl de mezcla maestra de sonda LC480 (Roche, Basel, Suiza), 2 µl de ADN molde (a 5 ng/µl), 0,25 µl de pareja de cebadores (10 µM cada uno), 0,125 µl de sonda Taqman (10 µM). Las condiciones de reacción incluían la etapa de inicio durante 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. El sistema en tiempo real se suministra con el software Lightcycler 480, versión 1.5, utilizando algoritmos de Roche únicos para un análisis automatizado de los datos altamente preciso y robusto.

10

Ensayo de especificidad y sensibilidad.

Se confirmó la especificidad de cada ensayo de especie mediante la amplificación de 100 ng de ADN genómico de pollo, pavo, caballo, burro, cerco, bovino y ovino y un control negativo sin ADN (NTC). Se sometió a ensayo cada ensayo frente a ADN procedente de las seis especies, frente a su especie diana y las 5 especies restantes para confirmar la especificidad. En el ensayo de sensibilidad de los cebadores y sondas específicos, se examinaron amplificaciones por PCR entre los cebadores específicos y diluciones en serie de 3 veces de ADN aislados de carne de cada especie diana comprendidas entre 10 ng y 0,4 ng. Las curvas estándares para la totalidad de los 6 sistemas de detección se construyeron mediante la utilización del valor de Cp obtenido de la concentración de ADN correspondiente (fig. 3).

15

20

Resultados

En el presente estudio, se desarrollaron ensayos metagenómicos y de PCR en tiempo real basada en la amplificación del mismo fragmento del gen de miostatina genómico y se evaluaron para la detección y cuantificación de 6 especies frecuentes presentes en la carne y en productos cárnicos (cerdo, vaca, caballo, oveja, pollo y pavo).

25

Análisis metagenómico utilizando el gen MSTN

Se aplicó el ensayo metagenómico a dos preparaciones de carne comerciales, la primera compuesta de 50% de carne de vaca y 50% de carne de cerdo; la segunda compuesta de 50% de carne de vaca y 50% de carne de caballo. Las secuencias tratadas se compararon con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (fig. 4). El análisis metagenómico permitió la identificación de todos los componentes de la carne, aunque las proporciones no son totalmente representativas. La proporción de vaca resulta más importante en las dos muestras sometidas a ensayo en detrimento de las 2 otras especies. Para obtener un análisis más cuantitativo resulta importante evitar la competición entre los componentes de la carne, realizando de esta manera el análisis en la etapa exponencial debido a que todos los reactivos todavía están en exceso y la especie que se encuentra presente en una cantidad baja no competirá con las otras.

30

35

Cuantificación mediante qPCR utilizando el gen MSTN

Se diseñaron cebadores específicos de especie y sondas Taqman y se optimizaron las condiciones de amplificación mediante la utilización de estos cebadores y sondas.

Especificidad de los sistemas de sondas Taqman.

Se sometió a ensayo la especificidad de los 6 sistemas para 8 especies 100% puras de carne comunes y comerciales (cerdo, vaca, caballo, oveja, pollo, pavo, conejo y pato). No se obtuvo ninguna reacción cruzada con ninguno de los ADN de especie no diana (Tabla 2).

40

Tabla 2: Resultados de ensayo de especificidad y sensibilidad obtenidos con los conjuntos de cebadores específicos de especie-sondas.

Especie	Concentración de ADN (ng)	Valor medio de Cp $\pm$ SD					
		cerdo	vaca	oveja	caballo	pavo	pollo
especie diana	10	23,57 $\pm$ 0,11	23,99 $\pm$ 0,39	23,5 $\pm$ 0,05	24,14 $\pm$ 0,43	22,69 $\pm$ 0,15	23,34 $\pm$ 0,48
	3,3	25,16 $\pm$ 0,06	25,66 $\pm$ 0,19	25,06 $\pm$ 0,08	24,59 $\pm$ 0,62	24,29 $\pm$ 0,22	24,49 $\pm$ 0,51
	1,1	26,86 $\pm$ 0,02	27,28 $\pm$ 0,4	26,78 $\pm$ 0,05	26,99 $\pm$ 0,15	25,96 $\pm$ 0,15	26,08 $\pm$ 0,47
	0,36	28,47 $\pm$ 0,12	28,8 $\pm$ 0,25	28,45 $\pm$ 0,23	28,99 $\pm$ 0,64	28,07 $\pm$ 0,74	27,98 $\pm$ 0,19
	0,12	30,08 $\pm$ 0,03	30,44 $\pm$ 0,32	29,93 $\pm$ 0,11	30,0 $\pm$ 0,31	29,29 $\pm$ 0,11	29,73 $\pm$ 0,06
	0,04	$\pm$	31,8 $\pm$ 0,14	31,4 $\pm$ 0,58	32,12 $\pm$ 0,61	30,94 $\pm$ 0,16	31,14 $\pm$ 0,2
eficiencia de qPCR		1,937	1,968	1,886	1,991	1,963	1,99
pollo	10	ND	ND	ND	ND	ND	23,231 $\pm$ 0,4
pavo	10	ND	ND	ND	ND	22,72 $\pm$ 0,13	ND
caballo	10	ND	ND	ND	24,04 $\pm$ 0,37	ND	ND
burro	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
cerdo	10	23,39 $\pm$ 0,41	ND	ND	ND	ND	ND
vaca	10	ND	24,01 $\pm$ 0,32	ND	ND	ND	ND
oveja	10	ND	ND	23,46 $\pm$ 0,082	ND	ND	ND
De conejo	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pato	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND=no detectado.							

Sensibilidad y linealidad de los sistemas de sondas Taqman.

- 5 La sensibilidad y linealidad de los 6 sistemas Taqman se sometieron a ensayo mediante la utilización de una serie de diluciones de 3 veces del ADN genómico obtenido de cada especie diana partiendo de 10 ng de ADN diana. Se generó la curva estándar representando el valor de Cp resultante en comparación con el logaritmo de la concentración del ADN diana para someter a ensayo la linealidad. Estas regresiones lineales se estimaron con el software LC480
- 10 utilizando los algoritmos propios de Roche. Los valores de eficiencia (proporcionados por los algoritmos de Roche) para los sistemas de cerdo, vaca, oveja, caballo, pavo y pollo fueron de 1,937, 1,968, 1,886, 1,991, 1,963 y 1,99, respectivamente. Tal como es bien conocido, un intervalo aceptable para determinar la eficiencia de una reacción de qPCR y, de esta manera, la relación lineal entre el valor de Cp y la concentración de ADN es de entre 1,8 y 2,2 (eficiencia= $-1+10^{(-1/\text{pendiente})}$; una eficiencia perfecta= 2).

Métodos de normalización

- 15 Las fuentes de variabilidad pueden ser diversas (la naturaleza y cantidad de la muestra inicial; el procedimiento de aislamiento del ADN o finalmente la amplificación por PCR en tiempo real). La normalización esencialmente consiste en neutralizar los efectos de la variabilidad que impedirían comparar los datos y conducirían a conclusiones erróneas. La utilización de un gen normalizador es el método más completo para considerar prácticamente toda fuente de
- 20 variabilidad en la PCR en tiempo real. En el presente estudio los inventores decidieron utilizar como normalizador una región altamente conservada del fragmento de miostatina amplificado (fig. 2). Este normalizador debería presentar una eficiencia de amplificación similar debido a que los inventores utilizando cebadores similares para amplificarlo.

Para cuantificar los datos, los inventores podrían utilizar una cuantificación comparativa y el método de $\Delta\Delta C_t$. Con este método, se ajustó C_t para el gen de interés tanto en la muestra de ensayo como en la muestra calibradora (en la

presente memoria los inventores utilizaron una especie diana 100% pura) en relación al Ct del gen normalizador a partir de las mismas 2 muestras ($\Delta C_t \text{ muestra} - \Delta C_t \text{ calibrador} = \Delta \Delta C_t$). El valor de $\Delta \Delta C_t$ resultante se incorpora para determinar el factor de diferencia de expresión (factor de diferencia = $2^{-\Delta \Delta C_t}$).

- 5 La invención no se encuentra limitada por los Ejemplos y el experto en la materia apreciará las alternativas y modificaciones que podrían llevarse a cabo en cualquier etapa o componente tal como se describe en la presente memoria. Por tanto, la invención se encuentra limitada únicamente por el alcance de las reivindicaciones.

Resultados

Análisis metagenómico utilizando el gen MSTN

- 10 Se aplicó el ensayo metagenómico a 20 mezclas de ADN diferentes, incluyendo 8 ADN de mamífero y ave diferentes (vaca, cerdo, caballo, oveja, conejo, cabra, pavo y pollo), 13 mezclas compuestas de 2 especies con 50% de cada ADN y 7 mezclas compuestas de ADN de 4 especies con 25% de cada ADN.

- 15 Se preparó el ADN de cada especie y se eluyó a la misma concentración antes de mezclarlos. Debido a las diferencias de tamaño de los genomas, 100 ng de ADN contendrán una cantidad diferente del gen diana de miostatina común de una especie a otra, explicando por qué en una mezcla 50-50%, las especies de genoma pequeño (aves, conejo, ...) se sobreestimarán respecto a las especies de genoma más grande, como los mamíferos.

Por ejemplo, debido a que el tamaño del genoma de las aves es la mitad del tamaño del genoma de los mamíferos, 100 ng de ADN corresponderán a $3,5 \times 10^3$ copias de genoma de vaca, comparado con 9×10^3 copias de genoma de pollo. Así, a la misma concentración, la proporción de pollo será el doble de la proporción de mamíferos.

- 20 Las secuencias tratadas se compararon con una base de datos privada utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica. Se identificó correctamente la totalidad de las 8 especies en las 20 muestras sometidas a ensayo. Las proporciones de cada una son prácticamente representativas considerando el tamaño del genoma (fig. 5).

Análisis metagenómico utilizando ARNr ribosómico 12S.

- 25 Se aplicó el ensayo metagenómico a una mezcla de 14 ADN de mamífero y ave, añadidos todos a la misma concentración (*Sus scrofa*, *Anser anser*, *Gallus gallus*, *Bos Taurus*, *Ovis aries*, *Equus caballus*, *Meleagris gallopavos*, *Capra hircus*, *Antilocapra americana*, *Cervus elaphus*, *Anas platyrhynchos* y *Coturnix japonica* (fig 6). Las secuencias tratadas se compararon con la base de datos del NCBI utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica. El análisis metagenómico permitió identificar la totalidad de los 14 componentes, aunque las proporciones no son representativas (dependen de los tejidos cárnicos utilizados y el contenido de mitocondrias de cada uno).

30 Listado de secuencias

<110> Université de Liège and Quality Partner s.a.

<120> Métodos de detección

<130> 2013-55

<150> EP13199634.0

- 35 <151> 2013-12-27

<160> 103

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

- 40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1

- 45 agtctatgtt tatatttacc t 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

 <400> 2
 aatctygtt tatatttacc t 21

 5 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Cebador

 <400> 3
 tcatcrtctt ccaargagcc 20

 <210> 4
 <211> 51
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 4
 20 cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag agtctatgtt tatatttacc t 51

 <210> 5
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 5
 cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag aatctygtt tatatttacc t 51

 <210> 6
 30 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 6
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agactgcact catcrtcttc caargagcc 59

 <210> 7
 <211> 59
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 7
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atcgaggct catcrtcttc caargagcc 59

 45 <210> 8
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Cebador

	<400> 8 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag acgctcgaca tcatercttt ccaargagcc	60
	<210> 9 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
10	<400> 9 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agacgcactc tcatercttt ccaargagcc	60
	<210> 10 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 10 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agcactgtag tcatercttt ccaargagcc	60
20	<210> 11 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
25	<400> 11 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atcagacacg tcatercttt ccaargagcc	60
	<210> 12 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 12 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atatcgcgag tcatercttt ccaargagcc	60
35	<210> 13 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 13 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag cgtgtctcta tcatercttt ccaargagcc	60
45	<210> 14 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
50	<400> 14 gctagcagtc tatgtttata ttacct	27

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 actgcaaatac tygtttata ttacct 27
 10 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 16
 tcacrtctt ccaargagcc 20
 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Sus scrofa
 <400> 17
 ctgattgtg ctggtccc 18
 <210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Sus scrofa
 <400> 18
 gttccgtcg tagcgtga 18
 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Sus scrofa
 <400> 19
 tgtaatcat gtatgtggag acaaa 25
 35 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus
 <400> 20
 40 gctagcagtc tatgtttata ttacct 27
 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus
 45 <400> 21
 ttcatgcaga tcgcrgttga tcc 23
 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Bos taurus
 <400> 22
 actgcaaatac tctgtttata ttacct 27

<210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Bos taurus

5 <400> 23
 tgttgtgga gggaaaacac tacatcctc 29
 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Ovis aries
 <400> 24
 actgcaaadc ttgtttata ttacct 27
 <210> 25
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Ovis aries
 <400> 25
 catgctgtg gagacaaaac aataaatcct 30
 <210> 26
 20 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Equus caballus
 <400> 26
 gcaaactctc gtttatattt acctgtttg 29
 25 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Equus caballus
 <400> 27
 30 ggtaatgatt gttccgtcg tc 22
 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Equus caballus
 35 <400> 28
 ttcttgctgg tccagtggat ctaa 24
 <210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 40 <213> Meleagris gallopavo
 <400> 29
 gctagcagtc tatgtttata ttacct 27
 <210> 30
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Meleagris gallopavo
 <400> 30
 tgcagatttt agttcatccg gt 22
 <210> 31
 50 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 704 489 T3

	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 31		
	ggaactgatt gatca	15	
5	<210> 32		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Cebador		
	<400> 32		
	agtggaggag cyttgggyaa aag	23	
	<210> 33		
	<211> 1128		
15	<212> ADN		
	<213> Coturnix chinensis		
	<400> 33		
	atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttcg tgcagatata tgttgatccg	60	
	gtggctctcg atggcagtag tcagcccaca gagaacactg aaaaagacgg actgtgcaat	120	
	gcttgtacgt ggagacagaa caaaaaatcc tccagaatag aagccataaa aattcaaata	180	
	ctcagcaaac tgcgcctgga acaagcacct aacattagca gggacgttat taaacaactt	240	
	ctacccaaag ctccctccact gcaggaactg attgatcagt acgacgtcca gagagatgac	300	
	agtagcgatg gctcttttga agatgatgac tatcatgcca caaccgaaac gattatcaca	360	
	atgcctacgg agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aacccaaatg ttgcttcttt	420	
	aagtttagct ctaagataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattatg gatatacttg	480	
	aggcaagtcc aaaaacctac aacgggtgtt gtgcagatcc tgagactcat taaacctatg	540	
	aaagacggta caagatatac tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa ccagggaat	600	
	ggtatctggc agagtattga tgtgaagaca gtcttgcaaa attggctcaa acagcctgaa	660	
	tccaacttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagaatg gacgagatct tgctgtaaca	720	
	ttcccaggac caggtgaaga cggatcgaac ccatttttag aggtcagagt tacagataca	780	
	ccaaaacggc cccgcagaga ttttggcctt gactgtgatg agcactcaac agaactctga	840	
	tgttgctcgt accccttgac ggtggatttt gaagcttttg gatgggactg gattatagcg	900	
	cctaaaagat acaaagcaaa ttactgctct ggagaatgcg aatttgtatt tctacagaaa	960	
	taccctcaca ctcacctggt gcaccaagca aatccaagag gttcagcagg cccttgctgc	1020	
	acaccaccca agatgtcccc tataaatatg ctgtatttca atggaaaaga acaaataata	1080	
20	tatggaaaga taccagctat ggtttagat cgttgcgggt gctcatga	1128	
	<210> 34		
	<211> 1128		
	<212> ADN		
	<213> Gallus gallus		
25	<400> 34		

ES 2 704 489 T3

```

atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgcagatcgc ggttgatcca      60
gtggctctgg atggcagtag tcagcccaca gagaacgctg aaaaagacgg actgtgcaat      120
gcttgtagct ggagacagaa tacaaaatcc tccagaatag aagccataaa aattcaaatac      180
ctcagcaaac tgcgcctgga acaagcacct aacattagca gggacgttat taagcagctt      240
ttacccaaag ctccctccact gcaggaactg attgatcagt atgatgtcca gagggacgac      300
agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caaccgagac gattatcaca      360
atgcctacgg agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aacccaaatg ttgcttcttt      420
aagtttagct ctaaaatata atataacaaa gtagtaaagg cacaattatg gatatacttg      480
aggcaagtcc aaaaacctac aacgggtgtt gtgcagatcc tgagactcat taagcccatg      540
aaagacggta caagatatac tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa ccagggcact      600
ggtatctggc agagtattga tgtgaagaca gtgctgcaaa attgggtcaa acagcctgaa      660
tccaatttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagactg gacgagatct tgctgtcaca      720
ttcccaggac cgggtgaaga tggattgaac ccatttttag aggtcagagt tacagacaca      780
ccgaaacggt cccgcagaga ttttggcctt gactgtgatg agcactcaac ggaatcccga      840
tggtgtcgct acccgctgac agtggatttc gaagcttttg gatgggactg gattatagca      900
cctaaaagat acaaagccaa ttactgctcc ggagaatgtg aatttgtgtt tctacagaaa      960
taccgcgaca ctcacctggt acaccaagca aatcccagag gctcagcagg cccttgctgc     1020
acaccacca agatgtcccc tataaacatg ctgtatttca atggaaaaga acaaataata     1080
tatggaaaga taccagccat ggttgtagat cgttgcggtt gctcatga                    1128

```

<210> 35

<211> 1128

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 35

5

ES 2 704 489 T3

atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgctgatttc agttgatccg	60
gtggctcttg atgacggcag tcagcccaca gagaacgctg aaaaagatgg actgtgcaat	120
gcttgtacgt ggagacagaa tacaaaatct tccagaatag aagccataaa aattcaaadc	180
ctcagcaaac tgcgcctgga acaagctcct aacattagca gggatgttat taagcaactt	240
ttacccaaag ctccctccact acaggaactg attgatcaat atgacgtcca gagagacgac	300
agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caactgaaac gattatcaca	360
atgcctacag agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aacccaaatg ttgcttcttt	420
aagtttagct ctaaaatata atataacaaa gtagtaaagg cacaattgtg gatatacttg	480
aggcaagtcc aaaaacctac aacagtgttt gtgcagatcc tgagacttat taagcccatg	540
aaagacggtc caagatatac tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa ccagggcact	600
ggtatttggc agagtattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attggctcaa acagcctgaa	660
tccaatttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagaatg gacgagatct tgctgtaact	720
ttcccaggac caggtgaaga tggattgaat ccatttttag aggtcagagt tacagacaca	780
ccgaaacgat cccgcagaga ttttggcctt gactgcatg agcactcgac agaatcccga	840
tggtgtcgct acccactgac cgtggatttt gaagcttttg gatgggactg gattatcgcc	900
cctaaaagat acaaagccaa ttactgctct gaagaatgcg aatttgtatt tctacagaaa	960
taccgcacac ctcatcttgt gcaccaagcg aatcctagag gatcggcagg cccctgctgc	1020
acgcccacca agatgtcccc cataaatatg ttgtatttca atggaaaaga acaataata	1080
tacggaaaga taccagccat ggttgtagat cgttgcgggt gctcatga	1128

<210> 36

<211> 1128

<212> ADN

<213> Anser anser

5

<400> 36

atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgctgatttc agttgatccg	60
gtggctcttg atgacggtag tcagcccaca gagaatgctg aaaaagatgg actgtgcaat	120
gcttgtacat ggagacagaa tacaaaatct tccagaatag aagccataaa aattcaaadc	180

ES 2 704 489 T3

ctcagcaaac	tgctgtgga	acaagctcct	aacattagca	gggatgttat	taaacaactt	240
ttacccaaag	ctcctccact	acaggaactg	attgatcaat	atgacgtcca	gagagatgac	300
agtagcgatg	gctcttttga	agacgatgac	tatcatgccca	caactgaaac	gattatcaca	360
atgcctacag	agtctgattt	tcttgtacaa	atggagggaa	aacccaaatg	ttgcttcttt	420
aagtttagct	ctaaaataca	atataacaaa	gtagtaaagg	cacaattgtg	gatttacttg	480
aggcaagtc	aaaaacctac	aacagtgttt	gtgcagatcc	tgagacttat	taagcccatg	540
aaagacggga	caagatatatac	tggaattcgg	tctttgaaac	ttgacattga	cccaggcgct	600
gggtttgggc	agagtattga	tgtgaagaca	gtgttgcaaa	attggctcaa	acagcctgaa	660
tccaatttag	gcatacgaaat	aaaagctttt	gatgagaatg	gacgagatct	tgctgtaact	720
ttcccaggac	caggtgaaga	tggtattgaat	ccatttttag	aggtcagagt	tacagacaca	780
ccgaaacgat	cccgcagaga	ttttggcctt	gactgcgatg	agcactcgac	agaatccaga	840
tggtgtcgct	accactaac	tgtggatttt	gaagcttttg	gatgggactg	gattatcgca	900
cctaaaagat	acaaagccaa	ttactgcttt	ggagaatgtg	aatttgtatt	tctacagaaa	960
tatccgcaca	ctcatcttgt	acaccaagca	aatcctagag	gctcggcagg	cccctgtgc	1020
acgcccacca	agatgtcccc	cataaatatg	ttgtatttca	atggaaaaga	acaaataata	1080
tacggaaaga	taccagccat	ggtttagat	cgttgcgggt	gctcatga		1128

<210> 37

<211> 1140

<212> ADN

<213> Cervus elaphus

5

<400> 37

gattttaaaa	ccatgcaaaa	actgcaaatc	tgtgtttata	tttacctatt	tatgctgatt	60
gttgctggcc	cagtggatct	gaatgagaac	agcgagcaga	aggaaaatgt	ggaaaaagag	120
gggctgtgta	atgcatgttt	gtggagacaa	aacactaaat	ccttaaggct	agaagccata	180
aaaatccaaa	tcctcagtaa	acttcgcctg	gaaacagctc	ctaacatcag	caaagatgct	240
ataagacaac	ttctgcccac	agctcctcca	ctccgggaac	tgattgatca	gtacgatgtc	300
cagagagatg	acagcagtga	cggctccttg	gaagatgatg	actaccacgc	tacgacggaa	360
acggtcatta	ccatgcccac	ggagtctgat	cttctaacgc	aagtggaagg	aaaacccaaa	420
tggtgtctct	ttcagtttag	ctctaagata	caatacaata	aagtcgtaaa	ggcccaactg	480
tggtatatat	tgagacctgt	caagactcct	acgacgggtg	ttgtgcaa	cctgagactc	540
atcaaaacca	tgaaagacgg	tacaaggtat	actggaatcc	gatctctgaa	acttgacatg	600
aaccaggga	ctggtatttg	gcagagcatt	gacgtgaaga	cagtgttgca	aaactggctc	660
aaacaacctg	aatccaactt	aggcattgag	atcaaagctt	tagatgagaa	tgcccatgat	720

ES 2 704 489 T3

cttgctgtaa ccttcccaga accaggagaa gatggactga atcctttttt agaagtcaag 780
gtaacagaca caccaaaaag atctaggaga gattttgggc tcgattgtga tgagcactcc 840
acagaatctc gatgctgtcg ttaccctcta actgtggatt ttgaagctct tggatgggat 900
tggattattg cacctaaaag atataaggcc aattactgct ctggagaatg tgaatttgtg 960
tttttgcaaa agtatcctca taccatctt gtgcaccaag cgaaccccag tggttcagcc 1020
ggcccctgct gtactcctac aaagatgtct ccaattaata tgctatatatt taatgacaaa 1080
gaacaaataa tacatgggaa gattccagct atggtagtag atcgctgtgg gtgctcatga 1140

<210> 38

<211> 1128

<212> ADN

5 <213> Antilocapra americana

<400> 38

atgcaaaaac tgcaaatcta tgtttatatt tacctatcta tgctgattgt tgctggcccc 60
gtggatctga atgagaacag cgagcagaag gaaaatggg aaaaagagg gctgtgtaat 120
gcatgtttgt ggagacaaaa cactaaatcc tcaagactag aagccataaa aatccaaatc 180
ctcagtaaac tgcgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat aagacaactt 240
ttgcccaaag ctcccccgct ccgggaactg atcgatcagt acgacgtcca gagagatgac 300
agcagtgaac gctccttgga agacgatgac taccacgcta cgacggaaac ggtcattacc 360
atgccacagg agtctgatct tctaactcaa gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
caatttagct ctaagataca atacaataaa gtagtaaagg ccagctgtg gatatatctg 480
agacctgtca agactcctac gacagtgttt gtacaaatcc tgagactcat caaacccatg 540
aaagacggta caaggtatac tggaatccga tctctgaagc ttgacatgaa ccagggcgct 600
ggatattggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa actgggtcaa acaacctgaa 660
tccaaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gccatgatct tgctgtaacc 720
ttcccagaac caggagaaga tggactgaac ctttttttag aagtcaaggt agcagacaca 780
ccaaaaagat ctaggagaga ttttgggctc gattgtgatg agcactccac agaatctcga 840
tgctgtcggt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gatcattgca 900
cctaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagaatgtg aatttgtgtt ttacaaaag 960
tatcctcata cccatcttgt gcaccaagca aaccccagag gttcagcagg cccctgctgt 1020
actcctacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatatta atggcaaaga acaataata 1080
tacgggaaga ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga 1128

<210> 39

<211> 1140

<212> ADN

10 <213> Bos taurus

<400> 39

ES 2 704 489 T3

gattttaaaa ccatgcaaaa actgcaaata tctgtttata tttacctatt tatgctgatt	60
gttgctggcc cagtggatct gaatgagaac agcgagcaga aggaaaatgt ggaaaaagag	120
gggctgtgta atgcatgttt gtggaggga aacactacat cctcaagact agaagccata	180
aaaatccaaa tcctcagtaa acttcgcctg gaaacagctc ctaacatcag caaagatgct	240
atcagacaac ttttgcccaa ggctcctcca ctctggaac tgattgatca gttcgatgtc	300
cagagagatg ccagcagtga cggctccttg gaagacgatg actaccacgc caggacggaa	360
acggtcatta ccatgcccac ggagtctgat cttctaacgc aagtggaag aaaacccaaa	420
tgttgcttct ttaaatctag ctctaagata caatacaata aactagtaaa ggcccaactg	480
tggatatatc tgaggcctgt caagactcct gcgacagtgt ttgtgcaaact cctgagactc	540
atcaaaccce tgaagacgg tacaaggat actggaatcc gatctctgaa acttgacatg	600
aaccaggca ctggtatttg gcagagcatt gatgtgaaga cagtgttgca gaactggctc	660
aaacaacctg aatccaactt aggcattgaa atcaaagctt tagatgagaa tggccatgat	720
cttgctgtaa ccttcccaga accaggagaa gatggactga ctcttttttt agaagtcaag	780
gtaacagaca caccaaaaag atctaggaga gattttgggc ttgattgtga tgaactctcc	840
acagaatctc gatgctgtcg ttaccctcta actgtggatt ttgaagcttt tggatgggat	900
tggattattg cacctaaaag atataaggcc aattactgct ctggagaatg tgaatttgta	960
tttttgcaaa agtatcctca taccatctt gtgcaccaag caaacccag aggttcagcc	1020
ggcccctgct gtactcctac aaagatgtct ccaattaata tgctatatatt taatggcgaa	1080
ggacaaataa tatacgggaa gattccagcc atggtagtag atcgctgtgg gtgttcatga	1140

<210> 40

<211> 1128

<212> ADN

<213> Ovis aries

5

<400> 40

atgcaaaaac tgcaaatctt tgtttatatt tacctattta tgctgcttgt tgctggccca	60
gtggatctga atgagaacag cgagcagaag gaaaatgtgg aaaaaagg gctgtgtaat	120
gcatgcttgt ggagacaaaa caataaatcc tcaagactag aagccataaa aatccaaatc	180
ctcagtaagc ttcgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat aagacaactt	240
ttgccaagg ctctccact ccgggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac	300
agcagcgacg gctccttgga agacgatgac taccacgtta cgacggaaac ggtcattacc	360
atgccacgg agtctgatct tctagcagaa gtgcaagaaa aacccaaatg ttgcttcttt	420

ES 2 704 489 T3

aaatttagct ctaagataca acacaataaa gtagtaaagg cccaactgtg gatatatctg	480
agacctgtca agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg	540
aaagacggta caaggtatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcact	600
ggtatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa actgggtcaa acaacctgaa	660
tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gtcattgatct tgctgtaacc	720
ttcccagaac caggagaaga aggactgaat ccttttttag aagtcaaggt aacagacaca	780
ccaaaaagat ctaggagaga ttttgggctt gattgtgatg agcactccac agaattctga	840
tgctgtcggt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gattattgca	900
cctaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagaatgtg aatttttatt tttgcaaaag	960
tatcctcata cccatcttgt gcaccaagca aaccccaaag gttcagccgg cccttgctgt	1020
actcctacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatTTTA atggcaaaga acaaataata	1080
tatgggaaga ttccaggcat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga	1128

<210> 41
 <211> 1255
 <212> ADN
 <213> Capra hircus

5

<400> 41	
ctggtgtggc aagttgtctc tcagactggg caggcattaa cgtttggctt ggcgttactc	60
aaaagcaaaa gaaaagtaaa aggaagaagt aagagcaagg aaaaagattg tattgatttt	120
aaaaccatgc aaaaactgca aatctttgtt tatatttacc tatttatgct gcttgttgct	180
ggcccagtgg atctgaatga gaacagcgag cagaaggaaa atgtggaaaa aaaggggctg	240
tgtaatgcat gcttgtggag acaaaacaat aaatcctcaa gactagaagc cataaaaaatc	300
caaatcctca gtaagcttcg cctggaaaca gctcctaaca tcagcaaaga tgctataaga	360
caacttttgc ccaaggctcc tccactccgg gaactgattg atcagtacga tgtccagaga	420
gatgacagca gcgacggctc cttggaagac gatgactacc acgttacgac ggaaacggtc	480
attaccatgc ccacggagtc tgatcttcta gcagaagtgc aagaaaaacc caaatgttgc	540
ttctttaaat ttagctctaa gatacaacac aataaagtag taaaggcca actgtggata	600
tatctgagac ctgtcaagac tcctacaaca gtgtttgtgc aaatcctgag actcatcaaa	660
cccatgaaag acggtacaag gtatactgga atccgatctc tgaaacttga catgaaccca	720
ggcactggta tttggcagag cattgatgtg aagacagtgt tgcaaaactg gctcaaacaa	780
cctgaatcca acttaggcat tgaaatcaaa gctttagatg agaatgggtca tgatcttgct	840
gtaaccttcc cagaaccagg agaagaagga ctgaatcctt ttttagaagt caaggtacaa	900
gacacaccaa aaagatctag gagagatttt gggcttgatt gtgatgagca ctccacagaa	960
tctcgatgct gtcgttacct tctaactgtg gattttgaag cctttggatg ggattggatt	1020
attgcaccta aaagatatata ggccaattac tgctctggag aatgtgaatt tttatttttg	1080
caaaagtatc ctcataccca tcttgtgcac caagcaaac ccaaagggtc agccggccct	1140
tgctgtactc ctacaaagat gtctccaatt aatatgctat attttaatgg caaagaacaa	1200
ataatatatg ggaagattcc aggcattgta gtagatcgct gtgggtgctc atgag	1255

<210> 42
<211> 1128
<212> ADN
<213> Felis catus

5 <400> 42
atgcagaaac tgcaaatcta tgtttatatt tacctgttta tgctgattgt tgctggtcca 60
gtggatctaa atgagaacag tgagcaaaaa gaaaatgtgg aaaaagaggg gctgtgcaat 120
gcatgtactt ggagacaaaa cactaaatct tcaagaatag aagccataaa aattcagatc 180
ctcagtaaac ttgcctcgga aacggctccc aacatcagca aagatgctat aagacaactt 240
ttgcccaaag ctccctcgct ccgggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac 300
agcagtgatg gctctttgga agacgacgat taccacgcta ccacggaaac gatcattacc 360
atgccaccg agtctgatct tctaatagcaa gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
aaatttagct ctaaaataca atataataaa gtcgtaaagg cccaactgtg gatatatctg 480
agaccctga agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg 540
aaagacggt caaggtatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcact 600
ggtatattggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attggctcaa acagcctgaa 660
tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gtcattgatct tgctgtaacc 720
ttcccaggac caggagaaga tgggctgaat cccttttttag aagtcaagggt gacagacaca 780
ccaaaaagat ccagacgaga ttttgggctt gactgtgatg agcactcaac agaattctcg 840
tgctgtcgtt accctctcac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gattattgca 900
ccaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagagtgtg aatttgtgtt ttacaaaaa 960
tattctcata ctcatcttgt acaccaagca aacccagag gtccagcagg cccctgctgt 1020
actcccacca agatgtctcc aattaatatg ctatatatta atggcaagga acaataata 1080
tatgggaaaa ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga 1128

<210> 43
<211> 1128
<212> ADN
<213> Equus caballus

10 <400> 43
atgcaaaaac tgcaaatctc tgtttatatt tacctgtttg tgctgattct tgctggtcca 60

ES 2 704 489 T3

gtggatctaa atgagaacag cgagcaaaaa gaaaatgtgg aaaaagagg gctgtgcaat	120
gcatgtactt ggagacaaaa cactaaatct tcaagaatag aagccataaa aattcagatc	180
ctcagtaaac tgcgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat tagacaactt	240
ttgcccaag ctccctccact cggggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac	300
agcagtgatg gctccttgga agatgatgat taccacgga cgacggaaac aatcattacc	360
atgcctacag agtctgatct tctaatagcaa gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt	420
aaatttagct ctaaaataca atacaataaa gtagtaaagg cccaactgtg gatatatctg	480
agacccgtca agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg	540
aaagacggta caaggtatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcgct	600
ggatattggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attgggtcaa acagcctgaa	660
tccaacttag gcatgtgaat caaagcttta gatgagaatg gtcattgatct tgctgtaacc	720
ttccaagac caggagaaga tgggctgaat ccatttttag aagttaaggt aacagacaca	780
ccaaaacgat ccagaagaga ttttgactt gactgtgatg agcactccac agaactctga	840
tgctgtcgtt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gattattgca	900
ccaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagagtgtg aatttgtatt ttacaaaaa	960
tatcctcaca ctcatcttgt acaccaagca aacccagag gttcagcagg cccctgtgt	1020
actcccacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatTTTA atggcaaaga acaaataata	1080
tatgggaaaa ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga	1128

<210> 44

<211> 1128

<212> ADN

<213> Sus scrofa

5

<400> 44

atgcaaaaac tgcaaatcta tgtttatatt tacctgttta tgctgattgt tgctgggtccc	60
gtggatctga atgagaacag cgagcaaaaag gaaaatgtgg aaaaagagg gctgtgtaat	120
gcatgtatgt ggagacaaaa cactaaatct tcaagactag aagccataaa aattcaaatc	180
ctcagtaaac ttcgcctgga aacagctcct aacattagca aagatgctat aagacaactt	240
ttgcccaag ctccctccact cggggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac	300
agcagtgatg gctccttgga agatgatgat tatcacgcta cgacggaaac gatcattacc	360
atgcctacag agtctgatct tctaatagcaa gtggaaggaa aacccaaatg ctgcttcttt	420
aaatttagct ctaaaataca atacaataaa gtagtaaagg cccaactgtg gatatatctg	480
agacccgtca agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg	540
aaagacggta caaggtatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcact	600

ES 2 704 489 T3

	ggatatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attgggtcaa acaacctgaa	660
	tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gtcattgatct tgctgtaacc	720
	ttcccaggac caggagaaga tgggctgaat cccttttttag aagtcaaggt aacagacaca	780
	ccaaaaagat ccaggagaga ttttgactc gactgtgatg agcactcaac agaattctga	840
	tgctgtcgtt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggactg gattattgca	900
	ccaaaaagat ataaggccag ttactgctct ggagagtgtg aatttgtatt ttacaaaaa	960
	taccctcaca ctcatcttgt gcaccaagca aacccagag gttcagcagg cccctgctgt	1020
	actcccacaa agatgtctcc aatcaatatg ctatatTTTA atggcaaaga acaaataata	1080
	tatgggaaaa ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga	1128
	<210> 45	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Equus caballus	
	<400> 45	
	acaccgcccgc tcaccctc	18
	<210> 46	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Equus caballus	
	<400> 46	
	gtaccgtaag ggaacgatga	20
	<210> 47	
	<211> 18	
15	<212> ADN	
	<213> Felis catus	
	<400> 47	
	acaccgcccgc tcaccctc	18
20	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Felis catus	
	<400> 48	
25	gtaccgtaag ggaacgatga	20
	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> BT1	
30	<400> 49	
	acaccgcccgc tcaccctc	18
	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> BT1	
	<400> 50	
	gtaccgcaag ggaacgatga	20
	<210> 51	
	<211> 18	
40	<212> ADN	
	<213> BT2	

	<400> 51 acaccgcccgcg tcaccctc	18
5	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> BT2	
	<400> 52 gtaccgcaag ggaacgatga	20
10	<210> 53 <211> 18 <212> ADN <213> Capra hircus	
	<400> 53 acaccgcccgcg tcaccctc	18
15	<210> 54 <211> 20 <212> ADN <213> Capra hircus	
20	<400> 54 gtaccgtaag ggaatgatga	20
	<210> 55 <211> 18 <212> ADN <213> Canis lupis familiaris	
25	<400> 55 acaccgcccgcg tcaccctc	18
	<210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> Canis lupus familiaris	
30	<400> 56 gtaccgtaag ggaatgatga	20
	<210> 57 <211> 18 <212> ADN <213> SS-Pietrain	
35	<400> 57 acaccgcccgcg tcaccctc	18
	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> SS-Pietrain	
40	<400> 58 gtaccgtaag ggaaagatga	20
	<210> 59 <211> 18 <212> ADN <213> SS-LW	
45	<400> 59 acaccgcccgcg tcaccctc	18
50	<210> 60 <211> 20	

<212> ADN
 <213> SS-LW

 <400> 60
 gtaccgtaag ggaaagatga 20

 5 <210> 61
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus 1

 <400> 61
 10 ataccgccccg tcaccctc 18

 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus 1

 15 <400> 62
 gtaccgcaag ggaaagatga 20

 <210> 63
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Gallus gallus 2

 <400> 63
 ataccgccccg tcaccctc 18

 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Gallus gallus 2

 <400> 64
 gtaccgcaag ggaaagatga 20

 <210> 65
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Meleagris gallopavo

 <400> 65
 ataccgccccg tcaccctc 18

 35 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Meleagris gallopavo

 <400> 66
 40 gtaccgtaag ggaaagatga 20

 <210> 67
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Anser Anser

 45 <400> 67
 ataccgccccg tcaccctc 18

 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Anser anser

 <400> 68
 gtaccgtaag ggaaagatga 20

<210> 69
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Anas platyrhynchos
 5 <400> 69
 ataccgccccg tcaccctc 18

 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Anas Platyrrhynchos

 <400> 70
 gtaccgtaag ggaaagatga 20

 <210> 71
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 71
 20 ayaccgccccg tcaccctc 18

 <210> 72
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 72
 twggcttttc acctctac 18

 30 <210> 73
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 73
 twggcatgtc acctctac 18

 <210> 74
 <211> 57
 <212> ADN
 40 <213> artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 74
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agactgcaca yaccgcccgt caccctc 57

 45 <210> 75
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 50 <223> Cebador

 <400> 75

ES 2 704 489 T3

	cctatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agcgcgcgca yaccgcccgt caccctc	57
	<210> 76	
	<211> 57	
	<212> ADN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 76	
	cctatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agctctatca yaccgcccgt caccctc	57
10	<210> 77	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 77	
	cctatcccct gtgtgccttg gcagttctcag twggcttttc acctctac	48
	<210> 78	
	<211> 48	
20	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 78	
25	cctatcccct gtgtgccttg gcagttctcag twggcatgtc acctctac	48
	<210> 79	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 79	
	cctatcccct gtgtgccttg gcagttctcag twggcwtktc acctcta	47
	<210> 80	
35	<211> 1140	
	<212> ADN	
	<213> Cervus elaphus	
	<400> 80	
	gatttttaaaa ccatgcaaaa actgcaaatc tgtgtttata tttacctatt tatgctgatt	60
	gttgctggcc cagtggatct gaatgagaac agcgagcaga aggaaaatgt ggaaaaagag	120
	gggctgtgta atgcatgttt gtggagacaa aacactaaat ccttaaggct agaagccata	180
	aaaatccaaa tcctcagtaa acttcgcctg gaaacagctc ctaacatcag caaagatgct	240
	ataagacaac ttctgcccaa agctcctcca ctccgggaac tgattgatca gtacgatgtc	300
40	cagagagatg acagcagtga cggctccttg gaagatgatg actaccacgc tacgacggaa	360

acggtcatta ccatgcccac ggagtctgat cttctaacgc aagtggaagg aaaacccaaa 420
 tgttgcttct ttcagtttag ctctaagata caatacaata aagtcgtaaa ggcccaactg 480
 tggatatatc tgagacctgt caagactcct acgacgggtgt ttgtgcaaact cctgagactc 540
 atcaaaccga tgaagacggt tacaaggtat actggaatcc gatctctgaa acttgacatg 600
 aaccagga ctggtatttg gcagagcatt gacgtgaaga cagtgttgca aaactggctc 660
 aaacaacctg aatccaactt aggcattgag atcaaagctt tagatgagaa tggccatgat 720
 cttgctgtaa ccttcccaga accaggagaa gatggactga atcctttttt agaagtcaag 780
 gtaacagaca caccaaaaag atctaggaga gattttgggc tcgattgtga tgagcactcc 840
 acagaatctc gatgctgtcg ttaccctcta actgtggatt ttgaagctct tggatgggat 900
 tggattattg cacctaaaag atataaggcc aattactgct ctggagaatg tgaatttgtg 960
 tttttgcaa agtactctca taccatctt gtgcaccaag cgaacccag tggttcagcc 1020
 ggccctgct gtactcctac aaagatgtct ccaattaata tgctatattt taatgacaaa 1080
 gaacaaataa tacatgggaa gattccagct atggtagtag atcgctgtgg gtgctcatga 1140

<210> 81

<211> 1128

<212> ADN

5 <213> Antilocapra americana

<400> 81

atgcaaaaac tgcaaatcta tgtttatatt tacctatcta tgctgattgt tgctggcccc 60
 gtggatctga atgagaacag cgagcagaag gaaaatggg aaaaagagg gctgtgtaat 120
 gcatgtttgt ggagacaaaa cactaaatcc tcaagactag aagccataaa aatccaaatc 180
 ctgagtaaac tgcgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat aagacaactt 240
 ttgcccagg ctcctccgct ccgggaactg atcgatcagt acgacgtcca gagagatgac 300
 agcagtgacg gctccttgga agacgatgac taccacgcta cgacggaaac ggtcattacc 360
 atgccacgg agtctgatct tctaactcaa gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
 caatttagct ctaagataca atacaataaa gtagtaagg cccagctgtg gatatatctg 480
 agacctgtca agactcctac gacagtgttt gtacaaatcc tgagactcat caaacccatg 540
 aaagacggta caaggtatac tggaaatccga tctctgaagc ttgacatgaa cccaggcgtc 600
 ggtatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa actggctcaa acaacctgaa 660
 tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gccatgatct tgctgtaacc 720
 tccccagAAC caggagaaga tggactgaac ccttttttag aagtcaagg agcagacaca 780
 ccaaaaagat ctaggagaga ttttgggctc gattgtgatg agcactccac agaactctga 840
 tgctgtcggt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gatcattgca 900
 cctaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagaatgtg aatttgtgtt ttacaaaag 960
 tatcctcata cccatcttgt gcaccaagca aaccccagag gttcagcagg cccctgctgt 1020
 actcctacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatttta atggcaaaga acaataata 1080
 tacgggaaga ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga 1128

10 <210> 82

<211> 1128
<212> ADN
<213> *Coturnix chinensis*

<400> 82
atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttcg tgcagatata tgttgatccg 60
gtggctctcg atggcagtag tcagcccaca gagaacactg aaaaagacgg actgtgcaat 120
gcttgtagct ggagacagaa cacaaaatcc tccagaatag aagccataaa aattcaaatac 180
ctcagcaaac tgcgcctgga acaagcacct aacattagca gggacgttat taaacaactt 240
ctacccaaag ctccctccact gcaggaactg attgatcagt acgacgtcca gagagatgac 300
agtagcgatg gctctttgga agatgatgac tatcatgccca caaccgaaac gattatcaca 360
atgcctacgg agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
aagtttagct ctaagataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattatg gatatacttg 480
aggcaagtc aaaaacctac aacgggtgtt gtgcagatcc tgagactcat taaacccatg 540
aaagacggta caagatatat tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa cccaggcaat 600
ggtatctggc agagtattga tgtgaagaca gtcttgcaaa attggctcaa acagcctgaa 660
tccaacttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagaatg gacgagatct tgctgtaaca 720
ttcccaggac caggtgaaga cggatcgaac ccatttttag aggtcagagt tacagataca 780
ccaaaacggt cccgcagaga ttttggcctt gactgtgatg agcactcaac agaactctga 840
tggtgtcgct accccttgac ggtggatttt gaagcttttg gatgggactg gattatagcg 900
cctaaaagat acaaagcaaa ttactgctct ggagaatgcg aatttgtatt tctacagaaa 960
taccctcaca ctacactggt gcaccaagca aatccaagag gttcagcagg cccttgctgc 1020
acaccaccca agatgtcccc tataaatatg ctgtatttca atggaaaaga acaataata 1080
5 tatggaaaga taccagctat gggtgtagat cgttgcgggt gctcatga 1128

<210> 83
<211> 1014
<212> ADN
<213> *Xenopus tropicalis*

10 <400> 83
gacaaagata cattgtgcag tgcttgatc tggagacaga acagtaaata tacaaggctt 60

ES 2 704 489 T3

gaagctataa aaaccagat ccttagcaaa cttcgactgg aacaggcacc taatattagc	120
aaggatgcta taaaacacct tttacccaaa gcaccacctt tacaagattt aatagacaaa	180
tatgatgttc aaaaagatga aagcagtgtt ggtcatttgg aagaggatga ttatcatgtc	240
tctgctgaaa ctgttattat aatgcctacc gagtttggaa tttccattga tatgaaagaa	300
aaacctatct gttgcttttt taaattcagt tctaaagtgc agttgacaaa aatatcgaaa	360
gcacagctct ggatacattt aaaacctgtt caaaaacctt cgacagttgt tgtgcagatc	420
tcgagactca ttaagccttt gaaagatggt acaagataca ctggaatccg ctcactaaaa	480
cttgaaatga atccagggtt tggaacttgg cagagcatag atgtaaaaac tgtactgcaa	540
aattggctga ggcaaccga atccaatcta ggcattgaaa taagagcatt tgatggaaat	600
gggcaggatc ttgcagtaac cagtaatgaa gatggtctga gtccatttat ggaggccaag	660
attgtagaca caccaaaacg atttagaaga gactcagggc ttgactgtga tgagcattca	720
actgaaacta tgtgctgccg ataccatta acagttgatt ttgaggcatt tggctgggac	780
tgggtggttg ctccaaagag atataatgct aactactgct caggagaatg tggaattgaa	840
tatctgcaga aatacccaca tggccatggt gttaatcaag ctaaccccaa aggtcctaca	900
ggtccatggt gttccccaac caaatgtcc tccctaaata tgttatattt taatgatgat	960
gcagaagtta tccagggaaa gattccagcc atggtaatag atcgctgtgg gtgc	1014

<210> 84

<211> 1128

<212> ADN

<213> Felis catus

5

<400> 84

atgcagaaac tgcaaacta tgtttatatt tacctgttta tgctgattgt tgctggtcca	60
gtggatctaa atgagaacag tgagcaaaaa gaaaatgtgg aaaaagaggg gctgtgcaat	120
gcatgtactt ggagacaaaa cactaaatct tcaagaatag aagccataaa aattcagatc	180
ctcagtaaac ttgccttga aacggctccc aacatcagca aagatgctat aagacaactt	240
ttgcccagg ctcctccgct ccgggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac	300
agcagtgatg gctctttgga agacgacgat taccacgcta ccacggaaac gatcattacc	360
atgccaccg agtctgatct tctaatagca gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt	420
aaatttagct ctaaaataca atataataaa gtcgtaaagg cccaactgtg gatatatctg	480
agaccgtca agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg	540
aaagacggta caaggtatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcact	600
ggtatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attggctcaa acagcctgaa	660
tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gtcattgatct tgctgtaacc	720

ES 2 704 489 T3

ttcccaggac	caggagaaga	tgggctgaat	cccttttttag	aagtcaaggt	gacagacaca	780
ccaaaaagat	ccagacgaga	ttttgggctt	gactgtgatg	agcactcaac	agaatctcgg	840
tgctgtcgtt	accctctcac	tgtggatttt	gaagcttttg	gatgggattg	gattattgca	900
cccaaaaagat	ataaggccaa	ttactgctct	ggagagtgtg	aatttgtgtt	tttacaataa	960
tatcctcata	ctcatcttgt	acaccaagca	aaccccagag	gttcagcagg	cccctgctgt	1020
actcccacca	agatgtctcc	aattaatatg	ctatatttta	atggcaagga	acaaataata	1080
tatgggaaaa	ttccagccat	ggtagtagat	cgctgtgggt	gctcatga		1128

<210> 85
 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> Sus scrofa

5

<400> 85		
atgcaaaaac	tgcaaatcta	tggttatatt
tggtgatctga	atgagaacag	cgagcaaaag
gcatgtatgt	ggagacaaaa	cactaaatct
ctcagtaaac	ttcgcttgga	aacagctcct
ttgccc aaag	ctcctccact	ccgggaactg
agcagtgatg	gctccttgga	agatgatgat
atgcctacag	agtctgatct	tctaatagca
aaatttagct	ctaaaataca	atacaataaa
agaccgtca	agactcctac	aacagtgttt
aaagacggt	caaggtatac	tggaaatccg
ggtatttggc	agagcattga	tgtgaagaca
tccaacttag	gcatgtgaaat	caaagcttta
ttcccaggac	caggagaaga	tgggctgaat
ccaaaaagat	ccaggagaga	ttttggactc
tgctgtcgtt	accctctaac	tgtggatttt
cccaaaaagat	ataaggccag	ttactgctct
taccctcaca	ctcatcttgt	gcaccaagca
actcccacaa	agatgtctcc	aatcaatatg
tatgggaaaa	ttccagccat	ggtagtagat

<210> 86
 <211> 1140
 <212> ADN
 <213> Bos taurus

10

<400> 86

ES 2 704 489 T3

gatttttaaaa ccatgcaaaa actgcaaatac tctgtttata tttacctatt tatgctgatt	60
gttgctggcc cagtggatct gaatgagaac agcgagcaga aggaaaatgt ggaaaaagag	120
gggctgtgta atgcatgttt gtggaggga aacactacat cctcaagact agaagccata	180
aaaatccaaa tcctcagtaa acttcgcctg gaaacagctc ctaacatcag caaagatgct	240
atcagacaac ttttgcccaa ggctcctcca ctctggaac tgattgatca gttcgatgct	300
cagagagatg ccagcagtga cggctccttg gaagacgatg actaccacgc caggacggaa	360
acggtcatta ccatgcccac ggagtctgat cttctaacgc aagtggaagg aaaacccaaa	420
tgttgcttct ttaaatctag ctctaagata caatacaata aactagtaaa ggcccaactg	480
tggatatatc tgaggcctgt caagactcct gcgacagtgt ttgtgcaaata cctgagactc	540
atcaaaccca tgaagacgg tacaaggtat actggaatcc gatctctgaa acttgacatg	600
aaccaggca ctggtatttg gcagagcatt gatgtgaaga cagtgttgca gaactggctc	660
aaacaacctg aatccaactt aggcattgaa atcaaaactt tagatgagaa tggccatgat	720
cttgctgtaa ccttcccaga accaggagaa gatggactga ctcttttttt agaagtcaag	780
gtaacagaca caccaaaaag atctaggaga gattttgggc ttgattgtga tgaactctcc	840
acagaatctc gatgctgtcg ttaccctcta actgtggatt ttgaagcttt tggatgggat	900
tggattattg cacctaaaag atataaggcc aattactgct ctggagaatg tgaatttgta	960
tttttgcaaa agtatcctca taccatctt gtgcaccaag caaacccag aggttcagcc	1020
ggcccctgct gtactcctac aaagatgtct ccaattaata tgctatatatt taatggcgaa	1080
ggacaaataa tatacgggaa gattccagcc atggtagtag atcgctgtgg gtgttcatga	1140

<210> 87

<211> 1128

<212> ADN

<213> Gallus gallus

5

<400> 87

atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgcagatcgc ggttgatcca	60
gtggctctgg atggcagtag tcagcccaca gagaacgctg aaaaagacgg actgtgcaat	120
gcttgtagct ggagacagaa taaaaatcc tccagaatag aagccataaa aattcaaatac	180
ctcagcaaac tgcgcctgga acaagcacct aacattagca gggacgttat taagcagctt	240
ttacccaaag ctctccact gcaggaactg attgatcagt atgatgtcca gagggacgac	300
agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caaccgagac gattatcaca	360
atgcctacgg agtctgattt tcttgtaaaa atggaggga aacccaaatg ttgcttcttt	420
aagtttagct ctaaaataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattatg gatatacttg	480

ES 2 704 489 T3

aggcaagtc aaacacctac aacgggtgtt gtgcagatcc tgagactcat taagcccatg 540
aaagacggta caagatatatc tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa ccagggcact 600
ggatctctggc agagtattga tgtgaagaca gtgctgcaaa attgggtcaa acagcctgaa 660
tccaatttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagactg gacgagatct tgctgtcaca 720
ttcccaggac cgggtgaaga tggattgaac ccatttttag aggtcagagt tacagacaca 780
ccgaaacggt cccgcagaga ttttggcctt gactgtgatg agcactcaac ggaatcccga 840
tggtgtcgct acccgctgac agtggatttc gaagcttttg gatgggactg gattatagca 900
cctaaaagat acaaagccaa ttactgctcc ggagaatgtg aatttgtgtt tctacagaaa 960
taccgcaca ctcacctggt acaccaagca aatcccagag gctcagcagg ccctgtgtgc 1020
acaccacca agatgtcccc tataaacatg ctgtatttca atggaaaaga acaaataata 1080
tatggaaaga taccagccat ggtttagat cgctgcgggt gctcatga 1128

<210> 88

<211> 1128

<212> ADN

5 <213> Equus caballus

<400> 88

atgcaaaaac tgcaaatctc tgtttatatt tacctgtttg tgctgattct tgctggtcca 60
gtgatctaa atgagaacag cgagcaaaaa gaaatgtgg aaaaagagg gctgtgcaat 120
gcatgtactt ggagacaaaa cactaaatct tcaagaatag aagccataaa aattcagatc 180
ctcagtaaac tgcgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat tagacaactt 240
ttgcccaaag ctccctccact ccgggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac 300
agcagtgatg gctctttgga agatgatgat taccacgcca cgacggaaac aatcattacc 360
atgcctacag agtctgatct tctaatagca gtggaaggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
aaatttagct ctaaaatata atacaataaa gtagtaaagg cccaactgtg gatatatctg 480
agaccgtca agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg 540
aaagacggta caaggtatatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcgct 600
ggatatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attgggtcaa acagcctgaa 660
tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gtcattgatct tgctgtaacc 720
ttcccaagac caggagaaga tgggctgaat ccatttttag aagttaaggt aacagacaca 780
ccaaaacgat ccagaagaga ttttggactt gactgtgatg agcactccac agaactctga 840
tgctgtcgctt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gattattgca 900
ccaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagagtgtg aatttgtatt tttacaaaaa 960
tatcctcaca ctcattctgt acaccaagca aaccccagag gttcagcagg ccctgtgtgt 1020
actcccacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatatta atggcaaaga acaaataata 1080
tatgggaaaa ttccagccat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga 1128

10 <210> 89

<211> 1128

<212> ADN

<213> Ovis aries

<400> 89
atgcaaaaac tgcaaatctt tgtttatatt tacctattta tgctgcttgt tgctggccca 60
gtggatctga atgagaacag cgagcagaag gaaaatgtgg aaaaaaagg gctgtgtaat 120
gcatgcttgt ggagacaaaa caataaatcc tcaagactag aagccataaa aatccaaatc 180
ctcagtaagc ttcgcctgga aacagctcct aacatcagca aagatgctat aagacaactt 240
ttgcccaagg ctccctccact ccgggaactg attgatcagt acgatgtcca gagagatgac 300
agcagcgacg gctccttgga agacgatgac taccacgtta cgacggaaac ggtcattacc 360
atgcccacgg agtctgatct tctagcagaa gtgcaagaaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
aaatttagct ctaagataca acacaataaa gtagtaagg cccaactgtg gatatatctg 480
agacctgtca agactcctac aacagtgttt gtgcaaatcc tgagactcat caaacccatg 540
aaagacggta caagggtatac tggaatccga tctctgaaac ttgacatgaa ccagggcact 600
gggtatttggc agagcattga tgtgaagaca gtgttgcaaa actgggtcaa acaacctgaa 660
tccaacttag gcattgaaat caaagcttta gatgagaatg gtcatgatct tgctgtaacc 720
ttcccagaac caggagaaga aggactgaat ctttttttag aagtcaagg aacagacaca 780
ccaaaaagat ctaggagaga ttttgggctt gattgtgatg agcactccac agaatctcga 840
tgctgtcggt accctctaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggattg gattattgca 900
cctaaaagat ataaggccaa ttactgctct ggagaatgtg aatttttatt tttgcaaaag 960
tatcctcata cccatcttgt gcaccaagca aaccccaaag gttcagccgg cccttgctgt 1020
actcctacaa agatgtctcc aattaatatg ctatatatta atggcaaaga acaataata 1080
tatgggaaga ttccaggcat ggtagtagat cgctgtgggt gctcatga 1128

<210> 90
<211> 1255
<212> ADN
<213> Capra hircus

<400> 90
ctggtgtggc aagttgtctc tcagactggg caggcattaa cgtttggtt ggcgttactc 60
aaaagcaaaa gaaaagttaa aggaagaagt aagagcaagg aaaaagattg tattgatatt 120
aaaaccatgc aaaaactgca aatctttgtt tatatttacc tatttatgct gcttgttgc 180

5

ggcccagtg atctgaatga gaacagcgag cagaaggaaa atgtggaaaa aaaggggctg 240
tgtaatgcat gcttgtggag acaaaacaat aaatcctcaa gactagaagc cataaaaaatc 300
caaatcctca gtaagcttcg cctggaaaca gctcctaaca tcagcaaaga tgctataaga 360
caacttttgc ccaaggctcc tccactccgg gaactgattg atcagtacga tgtccagaga 420
gatgacagca gcgacggctc cttggaagac gatgactacc acgttacgac ggaaacggtc 480
attaccatgc ccacggagtc tgatcttcta gcagaagtgc aagaaaaacc caaatgttgc 540
ttcttttaaat ttagctctaa gatacaacac aataaagtag taaaggccca actgtggata 600
tatctgagac ctgtcaagac tctacaaca gtgtttgtgc aaatcctgag actcatcaaa 660
cccatgaaag acggtacaag gtatactgga atccgatctc tgaaacttga catgaaccca 720
ggcactggta tttggcagag cattgatgtg aagacagtgt tgcaaaactg gctcaaacia 780
cctgaatcca acttaggcat tgaaatcaaa gctttagatg agaatgggtca tgatcttgct 840
gtaaccttcc cagaaccagg agaagaagga ctgaatcctt ttttagaagt caaggttaaca 900
gacacaccaa aaagatctag gagagatttt gggcttgatt gtgatgagca ctccacagaa 960
tctcgatgct gtcgttacct tctaactgtg gattttgaag cctttggatg ggattggatt 1020
attgcaccta aaagatatata ggccaattac tgctctggag aatgtgaatt tttatttttg 1080
caaaagtatc ctcataccca tcttgtgcac caagcaaac ccaaagggtc agccggccct 1140
tgctgtactc ctacaaagat gtctccaatt aatatgctat attttaatgg caaagaacia 1200
ataatatatg ggaagattcc aggcattgta gtagatcgct gtgggtgctc atgag 1255

<210> 91

<211> 1128

<212> ADN

5 <213> Anas platyrhynchos

<400> 91

atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgctgatttc agttgatccg 60
gtggctcttg atgacggcag tcagcccaca gagaacgctg aaaaagatgg actgtgcaat 120
gcttgtacgt ggagacagaa taaaaatct tccagaatag aagccataaa aattcaaata 180
ctcagcaaac tgcgcctgga acaagctcct aacattagca gggatgttat taagcaactt 240
ttacccaaag ctctccact acaggaactg attgatcaat atgacgtcca gagagacgac 300
agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caactgaaac gattatcaca 360
atgcctacag agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
aagtttagct ctaaaataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattgtg gatatacttg 480
aggcaagtcc aaaaacctac aacagtgttt gtgcagatcc tgagacttat taagcccatg 540
aaagacggtc caagatatata tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa cccaggcact 600

ES 2 704 489 T3

ggatatttggc agagtattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attggctcaa acagcctgaa 660
 tccaattttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagaatg gacgagatct tgctgtaact 720
 ttcccaggac caggtgaaga tggattgaat ccattttttag aggtcagagt tacagacaca 780
 ccgaaacgat cccgcagaga ttttggcctt gactgcatg agcactcgac agaatccga 840
 tggtgtcgct acccactgac cgtggatttt gaagcttttg gatgggactg gattatcgcc 900
 cctaaaagat acaaagccaa ttactgctct gaagaatgcg aatttgtatt tctacagaaa 960
 taccgcaca ctcatcttgt gcaccaagcg aatcctagag gatcggcagg cccctgctgc 1020
 acgcccacca agatgtcccc cataaatatg ttgtatttca atggaaaaga acaaataata 1080
 tacggaaga taccagccat gggtgtagat cgttgcgggt gctcatga 1128

<210> 92
 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> Anser anser

5

<400> 92
 atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgctgatttc agttgatccg 60
 gtggctcttg atgacggtag tcagcccaca gagaatgctg aaaaagatgg actgtgcaat 120
 gcttgtacat ggagacagaa taaaaaatct tccagaatag aagccataaa aattcaaatac 180
 ctacgcaaac tgcgtctgga acaagctcct aacattagca gggatgttat taaacaactt 240
 ttacccaaag ctctccact acaggaactg attgatcaat atgacgtcca gagagatgac 300
 agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caactgaaac gattatcaca 360
 atgcctacag agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aacccaaatg ttgcttcttt 420
 aagtttagct ctaaaataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattgtg gatttacttg 480
 aggcaagtcc aaaaacctac aacagtgttt gtgcagatcc tgagacttat taagcccatg 540
 aaagacggga caagatatac tgggaattcgg tctttgaaac ttgacattga cccaggcgct 600
 ggttttgggc agagtattga tgtgaagaca gtgttgcaaa attggctcaa acagcctgaa 660
 tccaattttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagaatg gacgagatct tgctgtaact 720
 ttcccaggac caggtgaaga tggattgaat ccattttttag aggtcagagt tacagacaca 780
 ccgaaacgat cccgcagaga ttttggcctt gactgcatg agcactcgac agaatccga 840
 tggtgtcgct acccactaac tgtggatttt gaagcttttg gatgggactg gattatcgca 900
 cctaaaagat acaaagccaa ttactgcttt ggagaatgtg aatttgtatt tctacagaaa 960
 tatccgcaca ctcatcttgt acaccaagca aatcctagag gctcggcagg cccctgctgc 1020
 acgcccacca agatgtcccc cataaatatg ttgtatttca atggaaaaga acaaataata 1080
 tacggaaga taccagccat gggtgtagat cgttgcgggt gctcatga 1128

<210> 93
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> Cairina moschata

10

<400> 93

ES 2 704 489 T3

tgcgatgagc actcgacaga atcccgatgt tgtcgctacc cactgaccgt ggattttgaa	60
gcctttggat gggactggat tatcgcccct aaaagataca aagccaatta ctgctctgga	120
gaatgcgaat ttgtatttct acagaaatac ccgcacactc atcttgtaca ccaagcaaat	180
cctagaggct cggcaggccc ctgctgcacg cccaccaaga tgtcccccct aaatatgttg	240
tatttcaatg gaaaagaaca aataatatac ggaaagatac cagccatg	288

<210> 94

<211> 634

<212> ADN

5 <213> Capra hircus

<400> 94

ggatacggcg taaacgtggt aaagcactac atcaaataga gttaaattct aattaaactg	60
taaaaagcca taattacaac aaaaataaat gacgaaagta accctactgc agctgatata	120
ctatagctaa gacccaaact gggattagat accccactat gcttagccct aaacacaaat	180
aattacagaa acaaaattat tcgccagagt actaccggca acagcccgaa actcaaagga	240
cttgcggtg ctttataccc ttctagagga gcctgttcta taatcgataa accccgataa	300
acctcaccaa tccttgctaa tacagtctat ataccgcat cttcagcaaa ccctaaaaag	360
gaacaaaagt aagctcaatc acaacacata aagacgtag gtcaagggtg aacctatgga	420
atgggaagaa atgggctaca ttttctacct taagaaaatt aatacgaaag ccattatgaa	480
attaatgacc aaaggaggat ttagtagtaa actaagaata gagtgcctag ttgaattagg	540
ccatgaagca cgcacacacc gcccgtcacc ctctcaagt aaatacaatg cactcaagcc	600
tattaacacg catcaactac atgagaggag ataa	634

<210> 95

<211> 954

<212> ADN

10 <213> Canis lupus

<400> 95

taaaggtttg gtcctagcct tcctattagt ttttagtaga cttacacatg caagcctcca	60
cgccccagtg agaatgccct taaaatcacc agtgatctaa aggagcaggt atcaagcaca	120
ctcttaagta gctcataaca ccttgctaag ccacaccccc acgggatata gcagtataa	180
aaattaagcc ataaacgaaa gtttgactaa gccatactaa atagggttg taaatttcgt	240
gccagccacc gcggtcatat gattaaccca aactaatagg cctacggcgt aaagcgtgtt	300

ES 2 704 489 T3

caagatactt taactactaaa gttaaaactt aactaagccg taaaaagcta cagttatcat 360
 aaaataaacc acgaaagtga ctttataata atctgactac acgatagcta agacccaaac 420
 tgggattaga taccctacta tgcttagccc taaacataga taattttaca acaaaataat 480
 tcgccagagg actactagca atagcttaaa actcaaagga cttggcggtg ctttatatcc 540
 ctctagagga gcctgttcta taatcgataa accccgataa acctcaccac ctttcgctaa 600
 ttcagtctat ataccgccat cttcagcaaa ccctcaaaag gtagaacagt aagcacaatc 660
 attttacata aaaaagttag gtcaaggtgt aacttatgag gtgggaagaa atgggctaca 720
 ttttctaccc aagaacatct cagcaatgtt tttatgaaat taaaaactga aggaggattt 780
 agtagtaaat taagaataga gagcttaatt gaatagggcc atgaagcacg cacacaccgc 840
 ccgtcaccct cctcaagtaa taagacacaa ccataaccat attaacttaa ctaaacacaca 900
 agaggagaca agtcgtaaca aggtaagcat accggaaggt gtgcttgat taat 954

<210> 96

<211> 980

<212> ADN

5 <213> Sus scrofa

<400> 96

ttgcaaacac acagtaacag ctgcctgttc gtttagtctt aataaaatta cacatgcaag 60
 tatccgcgcc ccggtgagaa tgccctccag atcttaaaga tcaaaggagg cagttatcat 120
 tcacacttgc ttcgggagcg catcgcttg ctcaaccacc cccccacggg aaacagcagt 180
 gataaaaatt aagccatgaa cgaaagtgtg actaagttat attaataga gttggtaaat 240
 ctctgtgccag ccaccgcggt catacgatta acccaaattt atagatccac ggcgtaaaga 300
 gtgtttaaga aaaaaaatc acaatagagt taaattataa ctaagctgta aaaagcccta 360
 gttaaaataa aataaccac gaaagtgact ctaataatcc tgacacacga tagctaggac 420
 ccaaactggg attagatacc ccactatgcc tagccctaaa cccaaatagt tacataacaa 480
 aactattcgc cagagtacta ctgcgaactg cctaaaactc aaaggacttg gcggtgcttc 540
 acatccacct agaggagcct gttctataat cgataaacc c gatagacct taccaacct 600
 tgccaattca gcctatatac cgccatcttc agcaaaccct aaaaaggaa aatagtaagc 660
 acaatcatag cacataaaaa cgtaggcaa ggtgtagctt atgggttgga aagaaatggg 720
 ctacattttc tacataagaa taccaccat acgaaagttt ttatgaaact aaaaaccaa 780
 ggaggattta gcagtaaact aagaatagag tgcttgattg aataaggcca tgaagcacgc 840
 acacaccgcc cgtcaccctc ctcaagcatg tagtaataaa aataacctat attcaattac 900
 acaaccatgc aagaagagac aagtcgtaac aaggtaagca tactggaaag tgtgcttgga 960
 ttaccaaagc atagcataaa 980

<210> 97

<211> 892

<212> ADN

<213> Gallus gallus

10

<400> 97

aatgccccca aaccttttctt cccaagcaaa aggagcaggt atcaggcaca ctcagcagta 60
 gccccaaagacg ccttgcttaa gccacacccc cacgggtact cagcagtaat taaccttaag 120
 caataagtgt aaacttgact tagccatagc aaccaggggt tggtaaactct tgtgccagcc 180
 accgcggtca tacaagaaac ccaaatcaat agctacccgg cgtaaagagt ggccacatgt 240
 tatctgcacc agctaagatt aaaatgcaac caagctgtca taagcctaag atccacctaa 300
 acccaaccca aatccatctt agcctcaacg attaatTTTA acccacgaaa gctaggaccc 360
 aaactgggat tagatacccc actatgccta gccctaaatc tagatacctc ccatcacaca 420
 tgtatccgcc tgagaactac gagcacaac gcttaaaact ctaaggactt ggcggtgcc 480
 caaacccacc tagaggagcc tgttctataa tcgataatcc acgattcacc caaccacccc 540
 ttgccagcac agcctacata ccgccgtcgc cagcccacct ctaatgaaag aacaacagtg 600
 agctcaatag cccctcgcta ataagacagc tcaaggata gcctatgggg tgggagaaat 660
 gggctacatt ttctaacata gaacaaacga aaaaggacgt gaaacccgcc cttagaagga 720
 ggatttagca gtaaagttag atcatacccc ctaagctcac tttaagacgg ctctgaggca 780
 cgtacatacc gcccgtcacc ctcttcacaa gccatcaaca tcaataaata tataacttccc 840
 ctcccggcta aagacgaggc aagtcgtaac aaggttaagtg taccggaagg tg 892

<210> 98

<211> 971

<212> ADN

5 <213> Meleagris gallopavo

<400> 98

aaagacttag tcctaacctt actattgatt tttgctaaac atatacatgc aagtatccgc 60
 atgccagtga aaatgcccta accccttaag aaaagaataa aggagcaggt atcaggcaca 120
 ctctaagtga gccccaaagacg ccttgcttga gccacacccc cacgggtatt cagcagtaat 180
 taaccttaag caataagtgt aaacttgact tagccatagc aactttagggt ttggtaaatc 240
 ttgtgccagc caccgcggtc atacaagaaa cccaaatcaa tagccatccg gcgtaaagag 300
 tggtcacatg ctatctatac caattaagat caaagtgtaa ctaagctgtc ataagcccaa 360
 gattcaccta agcccagcct aaaaaatgat cttaacttaa cgatcaattt aaagccacga 420
 aagccagggc acaaaactggg attagatacc ccactatgcc tggccctaaa tcttgatact 480
 aatataactca cgtatccgcc tgagaactac gagcacaac gcttaaaact ctaaggactt 540
 ggcggtgcc taaacccacc tagaggagcc tgttctgtaa tcgataatcc acgatccacc 600
 caaccacctc ttgccaacac agcctacata ccgccgtcgc cagcccacct aaaatgaaag 660
 atcaatagtg agctcaatag tcccactaac aagacaggtc aaggtatagc ccatgagggtg 720
 gaagaaatgg gctacatttt ctaacataga acagacgaaa aagggcgtga aactcgccct 780
 tggaaggagg atttagcagt aaagtaagac catacttctc ttaagcctac ttaaagacgg 840
 ccctggggca cgtacatacc gcccgtcacc ctcttcacaa gctatcaatt tcaataaata 900
 ataccaaac ctagctaaag atgaggtaag tcgtaacaag gtaagcgtac cggaagggtgc 960
 gcttagacta c 971

10 <210> 99

<211> 989
 <212> ADN
 <213> Anser anser

<400> 99
 aaagacttag tcctaaccctt acggttggtt ttgctaaat atatacatgc aagtatccgc 60
 gccccagtgt aaacgccctc gaccacctac ccccatagag gccttgagga gcgggtatca 120
 ggcacaccca agtagtagcc caagacgcct cgctaagcca cgccccacg ggtattcagc 180
 agtaattaac attaagcaat gagtgc aaac ttgacttagt tatagcaaca gcctaacttc 240
 aagggttggt aaatcttggt ccagccaccg cggcatatac agaaacccaa atcaaccgtc 300
 ctattgacac ggcgtaaaga gtggtaaaat gcctatccta gctaactaag atcaaaatgc 360
 aactgagctg tcataagccc aagatgcacc taaacacacc attaagatga tcttaggaac 420
 taacgactga tttaaaccca cgaaagccag ggcccaaact gggattagat accccactat 480
 gcctggccct aaatcttgat acttacttta ccgaagtatc cgccagagaa ctacgagcac 540
 aaacgcttaa aactctaagg acttggcggt gccccaaacc cacctagagg agcctgttct 600
 acaatcgata atccccgatt aacccaacca ccccttgcca acacagccta cataccgccg 660
 tcgccagccc acctogaatg agagcacaac agtggacaca atagcacccc gctaataaga 720
 caggtaagg tatagcctat ggagtgaag aaatgggcta cattccctat tcatagggca 780
 cacggaaga agcgtgaaac cacttctgga aggcggattt agcagtaaag tgggacaata 840
 gagcctactt taagccggcc ctggggcacg tacataccgc ccgtcaccct cctcaaaagc 900
 cacatcccac ataactaata ccataaatac gctgaagatg aggtaagtcg taacaaggta 960
 5 agtgtaccgg aaggtgtact tagaatatc 989

<210> 100
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Anas platyrhynchos

10 <220>
 <221> misc-feature
 <222> (780)..(780)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 100

aaagacttag tcctaacctt acagttggtt tttgctagac atatacatgc agtatccgcg 60
 ccccagtgat aaatgccctc aatagccttc accccaggcc ttaaggagcg ggtatcaggc 120
 acaccaagc agtagcccaa gacgccttgc taagccacgc cccacgggt attcagcagt 180
 agttaacatt aagcaatgag tgcaaaactcg acttagtcat agcaagcctc cacccaaggg 240
 tcggtaaatc ttgtgccagc caccgcggtc atacaagaga cccaaatcaa ctgtcctaca 300
 agcggcgtaa agagtggtaa gatgcctatc ctacctaact aagatcaaaa tgcaactaag 360
 ctgtcgcaag cacaagatgc acctaaacac accatcaaga tgatcttaga aactagcgat 420
 taatttgaac ccacgaaagc cagggcccaa actgggatta gataccccac tatgcctggc 480
 cctaaatcctt gaacttacct taccgaagta tccgccatat aactacgagc acaaacgctt 540
 aaaactctaa ggacttggcg gtgcctaaac ccacctagag gagcctgttc tgtaatcgat 600
 gatccacgat caacccaacc gcccttgcc gaacacagcc tacataccgc cgtcgccagc 660
 ccacctcgaa tgagagcgca acagtgggcg caacagcacc ccgctaataa gacaggtcaa 720
 ggtatagcct atgggacgga agaaatgggc tacattccct atgcataggg cagcacggaan 780
 agaagtatga aactgcttct agaaggagga tttagcagta aagcgggaca ataaagctcg 840
 ctttaagccg gccctagggc acgtacatac cgcccgtcac cctcctcata agccacaccc 900
 ccacataact aataccacgt aaatgccaaa gatgaggtaa gtgtaacaag gtaagtgtac 960
 cggaaggtgt acttagaata c 981

<210> 101
 <211> 450
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

5

<400> 101
 aaactgggat tagatacccc actatgctta gccctaaact aaaatagctt accacaacaa 60
 agctattcgc cagagtacta ctagcaacag cctaaaactc aaaggacttg gcggtgcttt 120
 acatccctct agaggagcct gttccataat cgataaacc cgcataaacc caccatccct 180
 tgctaattca gcctatatac cgccatcttc agcaaacctt aaacaaggta ccgaagtaag 240
 cacaaatata caacataaaa acgttaggtc aaggtgtagc ccatgggatg gagagaaatg 300
 ggctacattt tctaccctaa gaacaagaac tttaaccggc acgaaagtct ccatgaaact 360
 ggagactaaa ggaggattta gcagtaaatt aagaatagag agcttaattg aatcaggcca 420
 tgaagcgcgc acacaccgcc cgtcacctc 450

<210> 102
 <211> 373
 <212> ADN
 <213> Felis catus

10

<400> 102

ES 2 704 489 T3

gcttagccct aaacttagat agttacccta aacaaaaacta tccgccagag aactactagc	60
aatagcttaa aactcaaagg acttggcggg gctttacatc cctctagagg agcctgttct	120
ataatcgata aaccccgata tacctcacca tctcttgcta attcagccta tataccgcca	180
tcttcagcaa accctaataaa ggaagaaaag taagcacaag tatcttaaca taaaaaagtt	240
aggtcaagggt gtagctcatg agatgggaag caatgggcta catcttctaa aattagaaca	300
cccacgaaga tccttacgaa actaagtatt aaaggaggat ttagtagtaa atttgagaat	360
agagagctca att	373

<210> 103

<211> 615

<212> ADN

5 <213> Bos taurus

<400> 103

cagccttcct gttaactctt aataaactta cacatgcaag catctacacc ccagtgagaa	60
tgccctctag gttattaaaa ctaagaggag ctggcatcaa gcacacaccc ttagctcac	120
gacgccttgc ttaaccacac cccacggga aacagcagtg aaaaaatta agccataaac	180
gaaagtttga ctaagttata ttaattagggt ttgggtaaat ctctgtccag ccaccgagg	240
catagcatta acccaagcta acaggagtac ggcgtaaaac gtgttaaagc accataccaa	300
atagggttaa attctaacta agctgtaaaa agccatgatt aaaataaaaa taaatgacga	360
aagtgaccct acaatagccg acgcactata gctaagaccc aaactgggat tagatacccc	420
actatgctta gccctaaaca cagatattac ataaacaaaa ttattcgcca gagtactact	480
agcaacagct taaactcaaa ggacttggcg gtgctttata tccttctaga ggagcctgtt	540
ctataatcga taaaccccgaa taaacctcac caattcttgc taatacagtc tatataccgg	600
catcttcaga aacct	615

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el origen u orígenes de especie del ADN en una muestra alimentaria, que comprende llevar a cabo un análisis metagenómico de las secuencias de la muestra alimentaria mediante secuenciación de alto rendimiento para identificar el ADN de por lo menos una especie, en donde el análisis metagenómico comprende la amplificación y secuenciación de una secuencia de ADN diana metagenómica que es parte del gen de miostatina (MSTN), seleccionándose dicha secuencia de ADN diana metagenómico para permitir: i) la coamplificación de la secuencia de ADN diana metagenómica a partir de una pluralidad de especies utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados que comprende cebadores que comprenden o que consisten en las secuencias SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3, y ii) la identificación del origen de especie de cualquier ADN diana metagenómico amplificado basándose en su secuencia, en donde el método comprende la etapa de amplificar el ADN diana utilizando un conjunto de cebadores que comprende o que consiste en las secuencias SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además una reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) específica de especie para amplificar y cuantificar una diana específica de especie del ADN de la especie identificada, y
- opcionalmente en donde la etapa de qPCR se selecciona de qPCR que utiliza un pigmento intercalante y qPCR que utiliza un cebador informador marcado o sonda, y
- opcionalmente en donde el cebador informador marcado o sonda es parte de un sistema informador fluorescente/desactivador u otro sistema informador fluorescente en donde la amplificación del ADN diana específico de especie da como resultado una reducción o eliminación de la desactivación de la fluorescencia u otro incremento de la fluorescencia, dando como resultado una señal fluorescente detectable, y
- opcionalmente en donde el sistema informador comprende una sonda de hidrólisis, una sonda de baliza molecular, una pareja de sondas de hibridación dual, un sistema de cebadores Amplifluor, un sistema de cebadores Scorpion, un sistema de encendido con la extensión o un sistema de cebadores QZyme.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia diana metagenómica presenta el mismo número de copias por genoma en cada una de las especies de las que se sospecha su presencia en la muestra alimentaria, de manera que permite una determinación de las proporciones relativas de los diferentes ADN identificados.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en donde la secuencia de ADN diana específica de especie es parte del gen MSTN.
5. Un método según cualquier reivindicación anterior, en donde la secuencia de ADN diana metagenómica se secuencia mediante un procedimiento para la secuenciación en paralelo masiva, y opcionalmente en donde el procedimiento para la secuenciación en paralelo masiva se selecciona de la secuenciación en emulsión y la secuenciación en fase sólida.
6. Un kit para la identificación metagenómica del ADN presente en una muestra alimentaria, que comprende un conjunto de cebadores para la amplificación metagenómica de una secuencia diana metagenómica en el gen de miostatina, seleccionándose dicha secuencia diana metagenómica para permitir: i) la coamplificación de la secuencia de ADN diana metagenómica a partir de una pluralidad de especies utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados del kit que comprende cebadores que comprenden o consisten en la secuencia SEQ ID nº 1, la SEQ ID nº 2 y SEQ ID nº 3, y ii) la identificación del origen de especie de cualquier ADN diana metagenómico amplificado basándose en su secuencia.
7. Un kit según la reivindicación 6, en donde la secuencia diana metagenómica presenta el mismo número de copias por genoma en cada especie de la que se sospecha su presencia en la muestra alimentaria, de manera que permite además una determinación de las proporciones relativas de los diferentes ADN identificados y/o
- en donde la secuencia diana metagenómica se selecciona para permitir la amplificación del ADN de por lo menos 12 o 13 especies diferentes utilizando un conjunto de cebadores comunes conservados.
8. Un método según la reivindicación 4 o el kit según la reivindicación 7, en donde por lo menos uno de los cebadores se modifica mediante la adición de una secuencia de adaptador, etiqueta o secuencia universal.
9. Un kit según la reivindicación 6 para el análisis de PCR cuantitativa de una secuencia diana específica de especie en una muestra alimentaria, comprendiendo dicho kit un conjunto adicional de cebadores y sondas para la amplificación y detección en tiempo real de una secuencia del gen de miostatina, seleccionándose dicha secuencia para permitir la amplificación y/o detección específica de especie.
10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para la identificación y cuantificación de por lo menos una secuencia diana específica de especie en una muestra alimentaria de una o más cualesquiera de una especie de un género seleccionado de *Sus*, *Gallus*, *Bos*, *Ovis*, *Equus*, *Meleagris*, *Felis*, *Capra*, *Antilocapra*, *Cervus*,

Anas, Anser y Coturnix, por ejemplo, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Equus caballus*, *Meleagris gallopavo*, *Felis catus*, *Capra hircus*, *Antilocapra americana*, *Cervus elaphus*, *Anas platyrhyncho*, *Anser anser* y *Coturnix chinensis*; o

5 un kit según la reivindicación 9, en donde la amplificación y/o detección específica de especie puede distinguir entre especies de un género seleccionado de *Sus*, *Gallus*, *Bos*, *Ovis*, *Equus*, *Meleagris*, *Felis*, *Capra*, *Antilocapra*, *Cervus*, *Ana*, *Anser* y *Coturnix*, por ejemplo, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Equus caballus*, *Meleagris gallopavo*, *Felis catus*, *Capra hircus*, *Antilocapra americana*, *Cervus elaphus*, *Anas platyrhyncho*, *Anser anser* y *Coturnix chinensis*.

10 11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la secuencia de ADN diana específica de especie se amplifica mediante un conjunto de cebadores y el amplicón resultante se detecta mediante una sonda de hibridación marcada, o un kit según la reivindicación 9, en donde el conjunto de cebadores y sondas se selecciona de por lo menos uno de:

15 a) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 17 y 18 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 19 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de cerdo (*Sus scrofa*), o

b) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 20 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 21 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pollo (*Gallus gallus*), o

20 c) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 22 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 23 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de vaca (*Bos taurus*), o

d) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 24 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 25 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de oveja (*Ovis aries*), o

25 e) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 26 y 27 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 28 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de caballo (*Equus caballus*), o

f) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 29 y 16 y una sonda que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID nº 30 para la cuantificación de secuencias de ADN procedentes de pavo (*Meleagris gallopavo*), o

30 g) cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 y/o 15 y 16 y una sonda que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID nº 31 o 32 para la cuantificación de ADN procedente de todas las especies en la muestra, y

opcionalmente en donde uno o más cualesquiera cebadores con SEQ ID nº 20, 22, 24 o 29 se sustituyen por una mezcla de cebadores que comprenden o consisten en las secuencias SEQ ID nº 14 y 15.

35 12. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, que comprende además cualquier reactivo adecuado para la utilización en el análisis metagenómico o de qPCR del contenido de ADN de una muestra alimentaria.

40 13. El uso de los cebadores según se define en la reivindicación 1 junto con los cebadores y sondas según la reivindicación 11 para la identificación metagenómica secuencial y cuantificación específica de especie del ADN en una muestra alimentaria, en donde la selección de cebadores y sondas específicas de especie utilizadas para la cuantificación, se basa en la identificación metagenómica del ADN de las especies presentes en la muestra alimentaria, y opcionalmente en donde la muestra alimentaria es una muestra de carne.

FIGURA 1

```

coturnixchinensis -----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTCGTGCAGATATCTGTT 54
Gallusgallus -----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTCATGCAGATCGCGGTT 54
Anasplatyrhynchos -----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTCATGCTGATTTTCAGTT 54
Anseranser -----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTCATGCTGATTTTCAGTT 54
cervuselaphus AAAACCATGCAAAAACGCAAAATCTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGATTGTTGCT 66
Antilocapraamericana -----ATGCAAAAACGCAAAATCTATGTTTATATTTACCTATCTATGCTGATTGTTGCT 54
Bostaurus AAAACCATGCAAAAACGCAAAATCTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGATTGTTGCT 66
Ovisaries -----ATGCAAAAACGCAAAATCTTTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGCTGTTGCT 54
Caprahircus AAAACCATGCAAAAACGCAAAATCTTTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGCTGTTGCT 180
Equuscaballus -----ATGCAAAAACGCAAAATCTGTTTATATTTACCTGTTTGTGCTGATTCTTGCT 54
Susscrofa -----ATGCAAAAACGCAAAATCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATTGTTGCT 54
*****
coturnixchinensis GATCCGGTGGCTCTCGATGGCAGTAGTCAGCCACAGAGAACACTGAAAAAGACGGACTG 114
Gallusgallus GATCCAGTGGCTCTGGATGGCAGTAGTCAGCCACAGAGAACGCTGAAAAAGACGGACTG 114
Anasplatyrhynchos GATCCGGTGGCTCTTGATGACGGCAGTCAGCCACAGAGAACGCTGAAAAAGATGGACTG 114
Anseranser GATCCGGTGGCTCTTGATGACGGTAGTCAGCCACAGAGAATGCTGAAAAAGATGGACTG 114
cervuselaphus GGCCCACTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 126
Antilocapraamericana GGCCCACTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 114
Bostaurus GGCCCACTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 126
Ovisaries GGCCCACTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 114
Caprahircus GGCCCACTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 240
Equuscaballus GTTCCAGTGGATCTAATGAGAACAGCGAGCAAAAAGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 114
Susscrofa GGTCCCGTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAAAAAGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTG 114
*****
coturnixchinensis TGCAATGCTTGTACGTGGAGACAGAACACAAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAAAT 174
Gallusgallus TGCAATGCTTGTACGTGGAGACAGAATACAAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAAAT 174
Anasplatyrhynchos TGCAATGCTTGTACGTGGAGACAGAATACAAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAAAT 174
Anseranser TGCAATGCTTGTACGTGGAGACAGAATACAAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAAAT 174
cervuselaphus TGTAATGCATGTTTGTGGAGACAAAACACTAAATCCTTAAGGCTAGAAGCCATAAAAAATC 186
Antilocapraamericana TGTAATGCATGTTTGTGGAGACAAAACACTAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATC 174
Bostaurus TGTAATGCATGTTTGTGGAGGAAAACACTACATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATC 186
Ovisaries TGTAATGCATGTTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATC 174
Caprahircus TGTAATGCATGTTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATC 300
Equuscaballus TGCAATGCATGTAATGTGGAGACAAAACACTAAATCCTCAAGAATAGAAGCCATAAAAAAT 174
Susscrofa TGTAATGCATGTATGTGGAGACAAAACACTAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAAT 174
*****
coturnixchinensis CAAATCCTCAGCAAACCTGCGCTGGAACAAGCACCTAACATTAGCAGGGACGTTATTAAG 234
Gallusgallus CAAATCCTCAGCAAACCTGCGCTGGAACAAGCACCTAACATTAGCAGGGACGTTATTAAG 234
Anasplatyrhynchos CAAATCCTCAGCAAACCTGCGCTGGAACAAGCTCCTAACATTAGCAGGGATGTTATTAAG 234
Anseranser CAAATCCTCAGCAAACCTGCGCTGGAACAAGCTCCTAACATTAGCAGGGATGTTATTAAG 234
cervuselaphus CAAATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA 246
Antilocapraamericana CAAATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA 234
Bostaurus CAAATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATCAGA 246
Ovisaries CAAATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA 234
Caprahircus CAAATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA 360
Equuscaballus CAGATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATTAGA 234
Susscrofa CAAATCCTCAGTAACTTGCCTGGAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGA 234
*****
coturnixchinensis CAACTTCTACCCAAAGCTCCTCCACTGCAGGAAGTATTGATCAGTACGACGTCCAGAGA 294
Gallusgallus CAGCTTTTACCCAAAGCTCCTCCACTGCAGGAAGTATTGATCAGTATGATGTCCAGAGG 294
Anasplatyrhynchos CAACTTTTACCCAAAGCTCCTCCACTACAGGAAGTATTGATCAATATGACGTCCAGAGA 294
Anseranser CAACTTTTACCCAAAGCTCCTCCACTACAGGAAGTATTGATCAATATGACGTCCAGAGA 294
cervuselaphus CAACTTCTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA 306
Antilocapraamericana CAACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGACGTCCAGAGA 294
Bostaurus CAACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCTGGAAGTATTGATCAGTTCGATGTCCAGAGA 306
Ovisaries CAACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA 294
Caprahircus CAACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA 420
Equuscaballus CAACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA 294
Susscrofa CAACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA 294
*****
coturnixchinensis GATGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAAACGATT 354
Gallusgallus GACGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAGACGATT 354
Anasplatyrhynchos GACGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAAACGATT 354
Anseranser GATGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAAACGATT 354
cervuselaphus GATGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTACACGCTACGACGGAAACGGTC 366
Antilocapraamericana GATGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTACACGCTACGACGGAAACGGTC 354
Bostaurus GATGCCAGCAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTACACGCTACGACGGAAACGGTC 366
Ovisaries GATGACAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTACACGTTACGACGGAAACGGTC 354

```

ES 2 704 489 T3

Caprahircus	GATGACAGCAGCGACGGCTCCTTGGGAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAACGGTC	480
Equuscaballus	GATGACAGCAGTGATGGCTCTTTGGGAAGATGATGATTACCACGCGACGACGGAACAATC	354
Susscrofa	GATGACAGCAGTGATGGCTCCTTGGGAAGATGATGATTATCAGCTACGACGGAACGATC	354
	** * * * * ***** * * * * * * * * *	

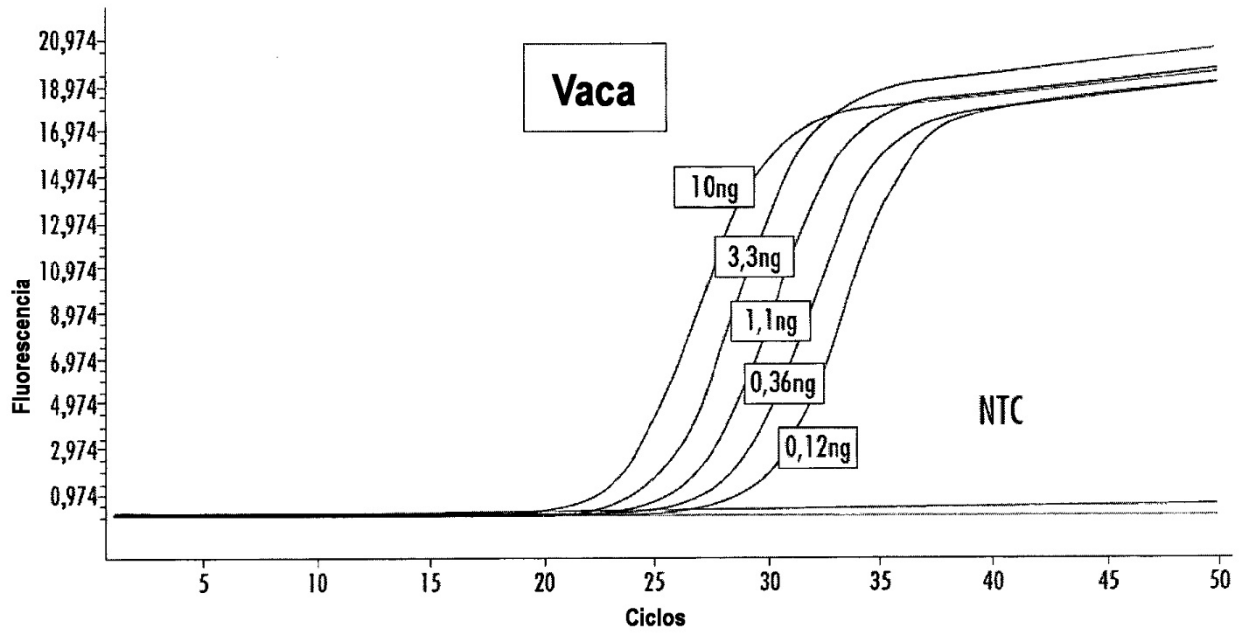
FIGURA 2

gi Ovis	-----ATGCAAAACTGCAAACTCTTGTGTTATATTTACCTATTTATGCTGCTTGTGCT	1
gi Capra	AAAACCATGCAAAACTGCAAACTCTTGTGTTATATTTACCTATTTATGCTGCTTGTGCT	1
gi Bos	AAAACCATGCAAAACTGCAAACTCTGTTTATATTTACCTATTTATGCTGATGTTGCT	1
gi Sus	-----ATGCAAAACTGCAAACTCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATGTTGCT	1
gi Equus	-----ATGCAAAACTGCAAACTCTGTTTATATTTACCTGTTTGTGCTGATGTTGCT	1/2
gi Meleagris	-----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATGTTGCT	1/2
gi Anser	-----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATGTTGCT	1
gi Gallus	-----ATGCAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATGTTGCT	1/2
***** ** * ** *		
gi Ovis	GGCCAGTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	
gi Capra	GGCCAGTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	
gi Bos	GGCCAGTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	
gi Sus	GGTCCGCTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	1
gi Equus	GGTCCGCTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	2
gi Meleagris	GATCCGCTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	2
gi Anser	GATCCGCTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	
gi Gallus	GATCCGCTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAGAAGGAAAATGTGGAAAAAAGGGGCTG	2
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *		
gi Ovis	TGTAATCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATC	2
gi Capra	TGTAATCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATC	2
gi Bos	TGTAATCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATC	
gi Sus	TGTAATCATGCTTGTGGAGACAAAACAATAAATCCTCAAGACTAGAAGCCATAAAAATC	2
gi Equus	TGCAATGCTGTACATGGAGACAGAATACTAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAATC	
gi Meleagris	TGCAATGCTGTACATGGAGACAGAATACTAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAATC	
gi Anser	TGCAATGCTGTACATGGAGACAGAATACTAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAATC	
gi Gallus	TGCAATGCTGTACATGGAGACAGAATACTAAATCCTCCAGAATAGAAGCCATAAAAATC	
** ** ** ** * ** * * ** *		
gi Ovis	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Capra	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Bos	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Sus	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Equus	CAGATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Meleagris	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Anser	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
gi Gallus	CAAAATCCTCAGTAAGCTTCGCCCTGGAAACAGCTCCTAACATCAGCAAAGATGCTATAAGA	
** ** ** ** * ** * * ** *		
gi Ovis	CAACTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGAAGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Capra	CAACTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGAAGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Bos	CAACTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGAAGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Sus	CAACTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGAAGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Equus	CAACTTTTGCCCAAGGCTCCTCCACTCCGGAAGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Meleagris	CAACTTTTACCCAAAGCTCCTCCACTGCAAGGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Anser	CAACTTTTACCCAAAGCTCCTCCACTGCAAGGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
gi Gallus	CAGCTTTTACCCAAAGCTCCTCCACTGCAAGGCTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGA	2
** ** ** ** * ** * * ** *		
sonda normalizadora		
gi Ovis	GATGACAGCAGCGACGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAACGGTC	3
gi Capra	GATGACAGCAGCGACGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAACGGTC	3
gi Bos	GATGACAGCAGCGACGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTACCACGTTACGACGGAACGGTC	3
gi Sus	GATGACAGCAGCGATGGCTCCTTGGAAAGATGATGATTACACGCTACGACGGAACGGTC	3
gi Equus	GATGACAGCAGCGATGGCTCCTTGGAAAGATGATGATTACACGCTACGACGGAACGGTC	3
gi Meleagris	GACGACAGTAGCGATGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAAGCGATT	3
gi Anser	GATGACAGTAGCGATGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAAGCGATT	3
gi Gallus	GACGACAGTAGCGATGGCTCCTTGGAAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAAGCGATT	3
** * ** ** * ** ** *		

Cebador directo 1 Cebador inverso 3 Sonda Tagman 2

FIGURA 3

(A)



(B)

Error: 0,0143
Eficiencia: 1,968
Pendiente: -3,400
Corte con Y: 30,48
Línea: 3,802

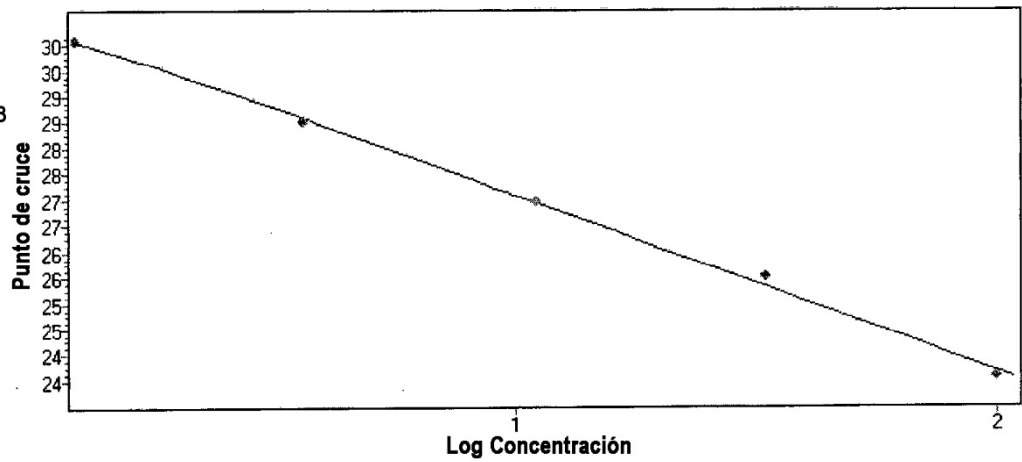


FIGURA 4

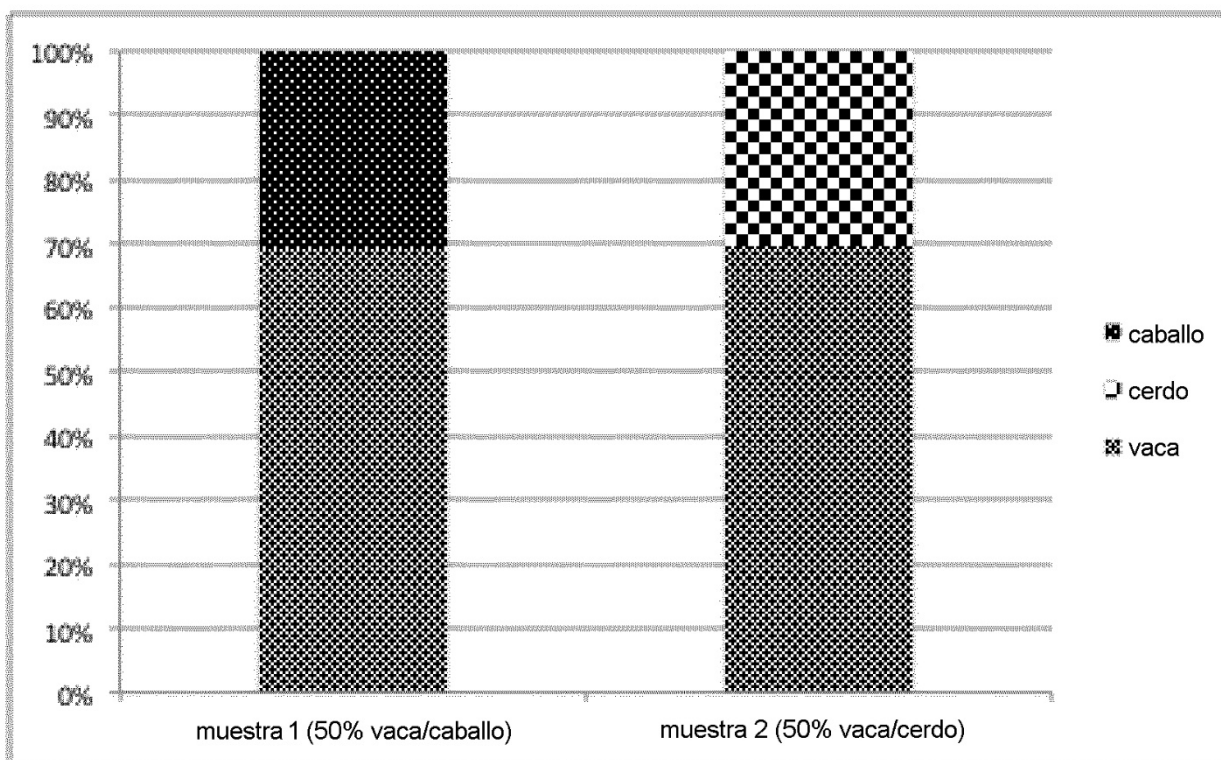


FIGURA 5

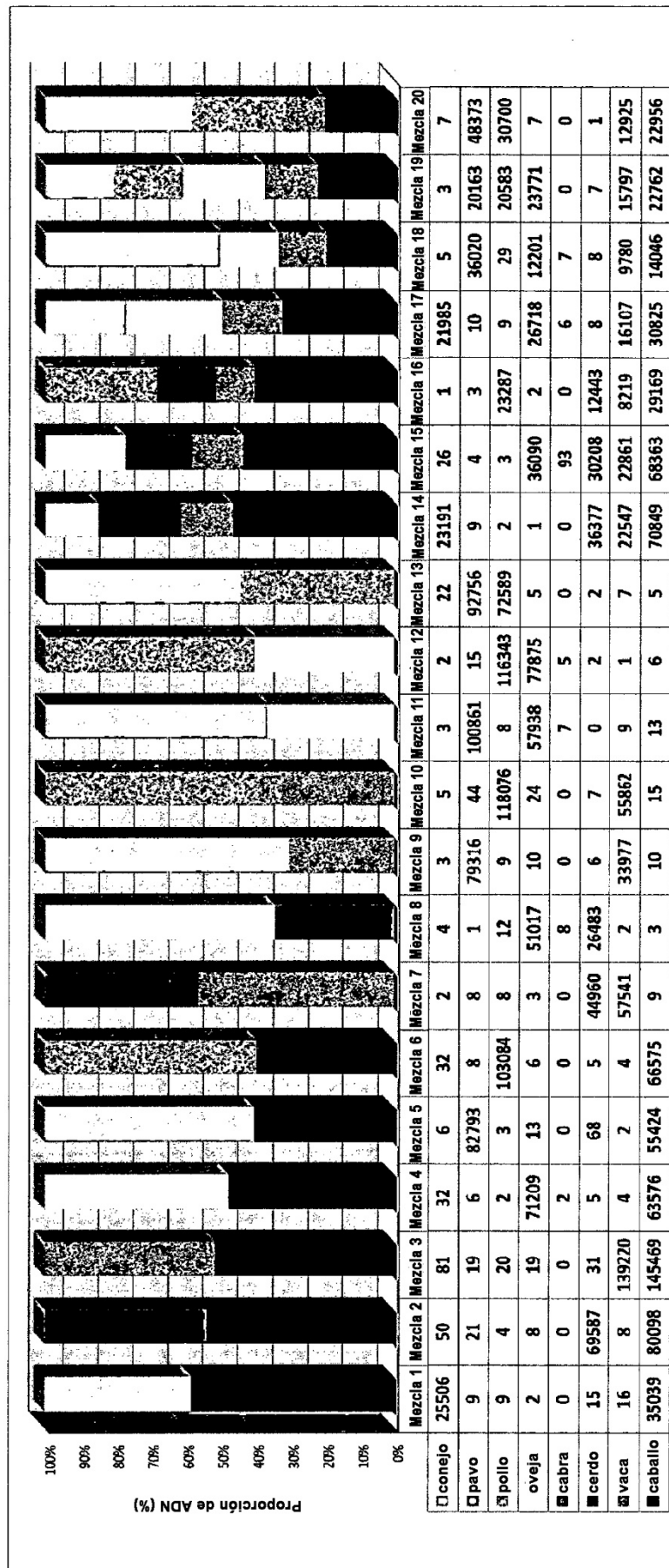


FIGURA 6

