

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 821**

21 Número de solicitud: 201031217

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

04.08.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.10.2012

Fecha de la concesión:

11.02.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.02.2013

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Edificio Severo Ochoa .Planta baja. Campus de
"El Cristo"
33009 OVIEDO (Asturias) ES

72 Inventor/es:

GARCÍA VÁZQUEZ, Eva;
HÓRREO ESCANDÓN, José Luis y
MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, José Luis

54 Título: **CEBADORES UNIVERSALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES, Y SUS USOS.**

57 Resumen:

Cebadores universales para la identificación de especies, y sus usos.

Se proporciona un método in vitro y un kit para la identificación a nivel taxonómico de al menos una especie biológica en una muestra. El método comprende (a) extracción de ADN de la muestra; (b) amplificación de un segmento del 16s ADNr con los cebadores oligonucleótidos: 16S-HF: 5'ATAACACGAGAAGACCCT 3', y 16S-HR1: 5'CCCACGGTCGCCCAAC 3', y/o, 16S-HR2: 5'CCCGCGGTCGCCCAAC 3', o equivalentes de estos cebadores; (c) secuenciación del fragmento amplificado o fragmentos amplificados; y, (d) comparación de la secuencia obtenida en la reacción de secuenciación del ADN del fragmento amplificado o fragmentos amplificados con las secuencias del 16S ADNr presentes en una base de datos.

ES 2 388 821 B2

DESCRIPCIÓN

Cebadores universales para la identificación de especies, y sus usos.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere al campo de la identificación de especies, basada en el uso de cebadores universales derivados de la secuencia del ADN ribosomal 16S.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La identificación de una o más especies en una muestra, en general, y la demanda de tests que proporcionen la trazabilidad del origen taxonómico de una o más especies en muestras biológicas o alimentarias han aumentado por distintas razones.

10 Los métodos actuales de identificación de especies se basan en ADN. Inicialmente estaban relacionados con las reacciones de hibridación pero han sido reemplazados por los basados en técnicas PCR (acción en cadena de la polimerasa; en inglés, Polymerase Chain Reaction): RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico; en inglés, Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; en inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism) y secuenciación de ADN.

15 Los métodos RAPD tienen varios inconvenientes, especialmente la dificultad de interpretación de los perfiles electroforéticos producidos por estas técnicas y el hecho de que son extremadamente dependientes de las variaciones en las condiciones de los laboratorios, haciendo muy difícil comparar resultados de distintos laboratorios. La PCR-RFLP tiene como gran desventaja que la posible aparición de mutaciones en las dianas de restricción puede producir fragmentos de ADN no digeridos y falsos resultados.

20 El análisis de la secuencias de ADN es actualmente el método más utilizado para la identificación molecular de especies (WO2005040423). Sin embargo, para obtener la suficiente información para una discriminación segura, esta técnica requiere la secuenciación de grandes regiones de ADN, generalmente sobre 300 pares de bases. La necesidad de amplificar fragmentos tan grandes puede llevar al fallo de la técnica cuando la muestra tiene poca cantidad de ADN o ADN degradado.

25 Los métodos basados en cebadores de PCR especie-específicos también han sido descritos para la identificación molecular de especies (US2005233334). La principal desventaja de dicho método es la necesidad de reacciones PCR independientes para detectar cada especie que pueda estar presente en la muestra.

Una reducción en el tamaño de los fragmentos amplificados que son secuenciados o en el número de cebadores usados implica comprometer la precisión del método.

30 En resumen, los métodos disponibles actualmente para la identificación de especies son de uso limitado. Sólo pueden confirmar la presencia de un número muy limitado de especies no relacionadas estrechamente, por lo que para abarcar un mayor número de especies interrelacionadas es necesario el uso de un mayor número de cebadores o la amplificación de fragmentos mayores de ADN.

35 Por todo ello, existe una necesidad de métodos rápidos, simplificados y precisos para la identificación molecular de cualquier especie en cualquier tipo de muestra.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

40 Se describe a continuación un nuevo acercamiento a la identificación de especies. El método se basa en la observación de que el fragmento del ADN ribosomal 16S (16S ADNr) no está bien conservado entre las diferentes especies pero sí lo está dentro de la misma especie. Los inventores han encontrado una secuencia nucleotídica dentro del gen 16S ribosomal más útil para la identificación de especies que aquellas utilizadas hasta el momento. Este hallazgo ha permitido satisfacer una antigua demanda, el desarrollo de un método mucho más específico, rápido y preciso para la identificación de especies utilizando cebadores universales para amplificar dicha secuencia nucleotídica del gen 16S ribosomal.

45 La presente invención proporciona tres cebadores universales, cebadores que hibridan en una región altamente conservada del gen 16S ribosomal, que amplifican un fragmento de dicho gen que es específico en cada especie en su secuencia de nucleótidos, y difiere así entre especies en su secuencia de nucleótidos. Consecuentemente, la presente invención proporciona también un método simplificado para la identificación de especies utilizando dichos cebadores. Este reducido número de cebadores utilizados en el método de la presente invención ni compromete la fiabilidad de los métodos ni la aplicabilidad de amplio espectro de dichos métodos en función del tipo y estado de la muestra en la que se aplican. Consecuentemente, los métodos de la presente invención son particularmente ventajosos para identificar especies en muestras degradadas debido al pequeño tamaño del producto amplificado. Dichos métodos también han

sido comprobados como especialmente adecuados para cualquier tipo de muestra, tanto fresca como procesada. Finalmente, los presentes métodos son especialmente adecuados para muestras con cantidades pequeñas, o de baja calidad, de ADN.

5 La presente invención, por lo tanto, proporciona un nuevo y preciso método *in vitro* para la identificación a nivel taxonómico de al menos una especie biológica en una muestra, que comprende las siguientes etapas: (a) extracción de ADN de la muestra; (b) amplificación de un segmento del 16s ADNr con los siguientes cebadores: 16SH-F (SEQ ID NO: 1): 5' ATAACACGAGAAGACCCT 3'; y 16SH-R1 (SEQ ID NO: 2): 5' CCCACGGTCGCCCAAC 3', y/o, 16SH-R2 (SEQ ID NO: 3): 5' CCCGCGGTCGCCCAAC 3', o las secuencias complementarias, o equivalentes de estos cebadores, difiriendo dichos equivalentes en la secuencia de alguno de los cebadores arriba especificados bien por adición o 10 eliminación de cualquiera de sus respectivas extremidades de uno o varios nucleótidos, o por cambio de uno o más nucleótidos dentro de dichas secuencias, o por una combinación de ambos, siempre que dichos equivalentes todavía hibriden con la misma diana de ARN o ADN como los cebadores correspondientes no modificados; (c) secuenciación del fragmento amplificado o fragmentos amplificados; y (d) comparación de la secuencia obtenida en la reacción de 15 secuenciación del ADN del fragmento amplificado o fragmentos amplificados con las secuencias del 16S ADNr presentes en una base de datos.

La presente invención es, por lo tanto, particularmente ventajosa para el etiquetado indispensable en alimentos comercializados en mercados internacionales. Los productos alimenticios comercializados en Europa deben mostrar una etiqueta declarando el nombre científico de las especies, tras la nomenclatura binomial estándar. La presente 20 invención es también particularmente ventajosa para detectar adulteraciones o diluciones ilegales, para controlar el comercio ilegal de especies en peligro o la suplantación entre especies.

Asimismo, los inventores han encontrado también que el método puede ser aplicado a cualquier tipo de muestra, materia prima, materia en cualquier fase de procesamiento, o a alimentos después de ser procesados. De acuerdo con una ventajosa realización del método de la invención, el ADN extraído de la muestra de materia orgánica puede estar 25 no degradado o ADN intacto proveniente de una muestra fresca; o ADN degradado o fragmentado, proveniente de una muestra que haya sido procesada, en particular, cocinada, liofilizada, secada, pasteurizada, etc.

Otro objeto de la presente invención es un oligonucleótido caracterizado por tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-3, o las secuencias complementarias.

También es objeto de la presente invención un juego de oligonucleótidos que consiste en un oligonucleótido que tiene la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, o la secuencia complementaria, y en un oligonucleótido que tiene la 30 secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o las secuencias complementarias.

Otro objeto de la presente invención es un juego de oligonucleótidos que consiste en los oligonucleótidos que tienen las secuencias correspondientes a las SEQ ID Nos: 1-3, o las secuencias complementarias.

También es parte de la presente invención un kit para la realización de los métodos de la presente invención que comprende cualquiera de los anteriores oligonucleótidos.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Amplificación de fragmentos de 6 especies diferentes de pescado obtenidos usando los cebadores universales de la invención, a saber, cebador delantero 16SH-F, cebador trasero 16SH-R1 y cebador trasero 16SH-R2 visualizados en un gel de agarosa al 1,5%. Las calles en el gel de izquierda a derecha corresponden a Salmo salar, Merluccius merluccius, Dicentrarchus labrax, Sardina pilchardus, Scopaeana notata, Mullus surmuletus, y el estándar de tamaños. En este estándar la banda más baja corresponde a 200 bp, y según ascienden, cada banda es 100 bp mayor que la 40 inmediatamente por debajo.

La FIG. 2 muestra el alineamiento de la secuencia obtenida usando el método de la presente invención para 4 especies diferentes de pescado, lubina (Dicentrarchus labrax), merluza europea (Merluccius merluccius), sardina (Sardina pilchardus) y pez escorpión (Scorpaena notata). Las diferencias del nucleótido entre las 4 secuencias en diferentes 45 posiciones de la secuencia de nucleótidos son evidentes.

Definiciones

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición que se indica cuando son utilizadas en la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

50 El término muestra es utilizado en su sentido más amplio para incluir muestras biológicas, médicas, agronómicas, industriales y medioambientales. La muestra también comprende alimentos, componentes alimenticios, derivados alimenticios y/o ingredientes alimenticios incluyendo aquellos formados en la industria láctea. La muestra puede ser líquida, sólida, en emulsión, gaseosa, en vapor, en gotas o en aerosol, o una combinación de cualquiera de ellos.

Los términos 16S ADN ribosomal, 16S ARN ribosomal, 16S ADNr o 16S ARNr son usados indistintamente para referirse al gen codificante del ARN ribosomal 16S.

Los términos oligonucleótido, cebador y cebador oligonucleótido son usados indistintamente.

5 El término especie o especies es usado en su sentido biológico, a saber, un rango taxonómico así como una unidad en ese rango definido por género y especie. Un rango taxonómico es un taxón con todos sus taxones subordinados y sus individuos. Ejemplos de rangos taxonómicos conocidos por un experto en la materia son (de general a más específico) dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género y especie.

10 El término región conservada es una secuencia que comprende múltiples nucleótidos que comparte un 100% de identidad entre especies. Una región variable es una secuencia que muestra menos del 100% de identidad entre especies pero muestra el 100% de identidad dentro de la misma especie.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención supera las limitaciones anteriormente mencionadas. Los inventores han encontrado que un fragmento específico del gen 16S ARNr puede ser aplicado en la identificación taxonómica de especies a partir de una muestra que contenga una sola especie o una mezcla heterogénea de especies.

15 Los inventores han diseñado tres cebadores universales, correspondientes a las SEQ ID NOs: 1-3, capaces de hibridar y amplificar específicamente un fragmento del gen 16S ADNr de cualquier especie, cuya secuencia nucleótida permite la identificación taxonómica de la especie correspondiente.

20 Los inventores también han encontrado que el gen 16S ribosomal contiene, además de zonas altamente conservadas ligadas al diseño de los cebadores, regiones hipervariables que pueden proporcionar secuencias útiles para la identificación especie-específica. La presente invención está basada en la caracterización de dos regiones en el gen 16S ribosomal que están suficientemente conservadas entre las especies y permiten el diseño de cebadores universales y donde dichas dos regiones flanquean una región variable entre especies pero conservada dentro de los individuos de la misma especie.

25 Basada en esto, la presente invención proporciona el método nuevo, sencillo y económico detallado en la breve descripción de la invención. Una realización de la presente invención está, por lo tanto, relacionada con dicho método que comprende además la clonación del fragmento amplificado o los fragmentos amplificados y la secuenciación del clon resultante o de cada uno de los clones resultantes. En otra realización preferida de la invención, la muestra puede contener una sola especie o una mezcla heterogénea de especies. En otra realización preferida de la invención, la secuencia del 16S ADNr presente en la base de datos es la secuencia completa o un fragmento de la misma que
30 comprende el fragmento amplificado usando al menos los cebadores correspondientes a las SEQ ID NOs: 1 y 2 y/o 3, o las secuencias complementarias.

En una realización preferida, las especies pertenecen a los siguientes rangos taxonómicos: Superreino Eukaryota, Reino Metazoa y Filo Chordata.

35 Cualquier procedimiento o kit conocido en el estado del arte para la extracción del ADN total puede ser utilizado en los métodos de la invención subyacente.

El método de amplificación utilizado en los métodos de la presente invención puede ser cualquier método adecuado para amplificar ácidos nucleicos conocido en estado del arte. En una realización preferida, el método de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como PCR o reacción PCR.

40 La técnica de secuenciación utilizada en los métodos de la presente invención puede ser cualquier método conocido en el estado del arte para obtener la secuencia de ácidos nucleicos. En una realización preferida, el método de secuenciación utilizado en los métodos de la presente invención es un método basado en la incorporación de dideoxynucleótidos marcados con fluorocromos utilizando la PCR (basado en el método Sanger).

Los métodos de la presente invención pueden también comprender la clonación del fragmento amplificado o los fragmentos amplificados previa al paso de secuenciación del clon resultante o de cada uno de los clones resultantes.

45 Las reacciones de amplificación y secuenciación pueden ser llevadas a cabo bajo las condiciones de los ejemplos. Sin embargo, cualquier otra condición que permita generar el producto amplificado y obtener la correspondiente secuencia nucleótida también es aplicable a los métodos de la presente invención.

50 Cualquier herramienta de comparación de secuencias disponible en el estado del arte es aplicable para llevar a cabo los métodos de la presente invención. En una realización preferida, la comparación de secuencias utilizada es la herramienta de alineamiento de secuencias de tipo local "Basic Local Alignment Search Tool" (también conocida como BLAST). Este programa está disponible en varias fuentes, incluyendo el National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En los métodos de la presente invención la secuencia del 16S ADNr

presente en la base de datos puede ser la secuencia completa o un fragmento de la misma que comprende el fragmento amplificado usando al menos los cebadores correspondientes a SEQ ID NOs: 1 y 2 y/o 3.

5 El diseño de los cebadores fue hecho a partir de las secuencias nucleotídicas disponibles del 16S ADN de 44 especies animales diferentes, accedidas en y extraídas de bases de datos públicas. Para el diseño de los cebadores, se buscó una región en el gen 16s ribosomal de menos de 100 nucleótidos con una secuencia que fuera diferente entre especies pero altamente conservada dentro de cada especie y estuviera flanqueada a ambos lados por regiones conservadas, de tal forma que los cebadores pudieran hibridar específicamente dichas regiones flanqueantes. Una región nucleotídica fue identificada que cumpliera con los requisitos anteriores (conservada entre individuos de la misma especie y variable entre especies).

10 Los cebadores correspondientes a las SEQ ID NOs: 1-3 fueron diseñados a partir de la mencionada región. La presente invención también se refiere a los cebadores mencionados o equivalentes de los mismos para llevar a cabo los métodos de la presente invención. El término equivalentes de un cebador se refiere a cebadores que difieren en secuencia de cualquiera de los arriba especificados, bien por adición o eliminación de cualquiera de sus respectivas extremidades de uno o varios nucleótidos, o por cambio de uno o más nucleótidos dentro de dichas secuencias, o por una combinación de ambos, siempre que dichos equivalentes todavía hibriden con la misma diana de ARN o ADN como los de la secuencia cebadora correspondiente no modificada. Dichos equivalentes comparten al menos un 75% de similitud, preferentemente más del 80%, preferentemente más del 85% y más preferentemente más del 95% de identidad de la secuencia con la correspondiente secuencia cebadora no modificada. Debe tenerse en cuenta que, cuando se usa un equivalente de un cebador, puede ser necesario modificar las condiciones experimentales para obtener la misma especificidad que el correspondiente cebador no modificado.

La similitud entre dos secuencias de ácidos nucleicos se refiere a la identidad de la secuencia. La identidad de la secuencia es frecuentemente medida en términos de porcentaje de identidad.

25 Los nucleótidos utilizados en los cebadores de la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contengan grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación. Asimismo, es obvio para una persona experta en la materia que cualquiera de los cebadores arriba especificados puede ser utilizado como tal, en su forma complementaria o en su forma ARN (donde Timina es sustituida por Uracilo).

30 La presente invención puede ser llevada a cabo mediante la utilización de un set de reactivos (kit) que comprenda los cebadores de la invención. El set de reactivos (kit) puede contener reactivos conocidos convencionalmente utilizados para PCR. Los reactivos incluyen dinucleótidos trifosfato, MgCl₂, Tris-HCl, glicerol, DMSO, ADN para control negativo, ADN para control positivo, Taq ADN polimerasa y agua destilada. Estos reactivos pueden ser proporcionados de forma individual o en una forma donde dos o más reactivos en el kit están mezclados entre sí.

35 Utilizando los cebadores de la presente invención, se obtuvieron amplicones con un tamaño entre 76 y 81 nucleótidos para todas las especies testadas. El análisis de secuencias de los fragmentos amplificados confirmó que las secuencias nucleotídicas para las distintas especies difieren al menos en un nucleótido, que es especie-específico, mientras que las secuencias obtenidas para distintos individuos de la misma especie mostraron un 100% de identidad con la secuencia de referencia de dichas especies disponible en la base de datos pública GenBank.

40 Los métodos de la presente invención son preferentemente llevados a cabo en secuencias de ADN; sin embargo, pueden ser también llevados a cabo en secuencias de ARN. En una realización preferida, los métodos de la presente invención son llevados a cabo en ADN extraído; sin embargo, pueden ser también directamente llevados a cabo en la muestra.

45 La presente invención puede ser aplicada con éxito a ADN extraído de cualquier tipo de muestra de alimentos procesados. En una realización preferida, la muestra puede ser pescado (atún en aceite, sardina en aceite, sardina en salsa de tomate, salmón al guisqui); carne enlatada (cerdo y pavo); pescado precocinado (palitos de pescado, salmón ahumado, trucha ahumada, bacalao en salazón, caviar y surimi); carne precocinada (salami, maigret, foie-gras, paté); alimento deshidratado para peces; comida para gatos y comida para perros (seca y húmeda). En resumen, la muestra utilizada en los métodos de la presente invención puede ser fresca o procesada.

50 La Tabla 1 que se muestra a continuación representa una lista de especies que son detectadas e identificadas de acuerdo con los métodos de la invención. Esta lista es, sin embargo, no exhaustiva, por lo que otras especies además de las mencionadas específicamente en la Tabla 1 pueden ser detectadas e identificadas de acuerdo con los métodos de la invención:

Tabla 1

Familia	Género	Especie	Nombre Común
Clupeidae	<u>Sardina</u>	<u>Sardina pilchardus</u>	Sardina
Engraulidae	<u>Engraulis</u>	<u>Engraulis encrasicolus</u>	Anchoa
Merlucciidae	<u>Merluccius</u>	<u>Merluccius merluccius</u>	Merluza europea
		<u>Merluccius australis</u>	Merluza austral (Nueva Zelanda)
		<u>Merluccius capensis</u>	Merluza del Cabo (Sur África)
		<u>Merluccius hubbsi</u>	Merluza argentina
		<u>Merluccius gayi</u>	Merluza chilena
		<u>Merluccius albidus</u>	Merluza blanca
Merlucciidae	<u>Merluccius</u>	<u>Merluccius bilinearis</u>	Merluza plateada
		<u>Lophius piscatorius</u>	Rape
		<u>Dicentrarchus labrax</u>	Besugo
Serranidae	<u>Dicentrarchus</u>	<u>Dicentrarchus labrax</u>	Besugo
Sparidae	<u>Sparus</u>	<u>Sparus aurata</u>	Lubina
Carangidae	<u>Trachurus</u>	<u>Trachurus mediterraneus</u>	Jurel mediterráneo
		<u>Trachurus trachurus</u>	Jurel atlántico
Sparidae	<u>Boops</u>	<u>Boops boops</u>	Boga
Sparidae	<u>Diplodus</u>	<u>Diplodus sargus</u>	Besugo blanco
Scombridae	<u>Scomber</u>	<u>Scomber scombrus</u>	Caballa
Scophtalmidae	<u>Scophtalmus</u>	<u>Scophtalmus rhombus</u>	Rodaballo
Scophtalmidae	<u>Lepidorhombus</u>	<u>Lepidorhombus whiffiagonis</u>	Gallo del Norte
		<u>Lepidorhombus boscii</u>	Gallo manchado
Soleidae	<u>Solea</u>	<u>Solea solea</u>	Lenguado
Gadidae	<u>Gadus</u>	<u>Gadus morhua</u>	Bacalao
Gadidae	<u>Melanogrammus</u>	<u>Melanogrammus aeglefinus</u>	Abadejo
Scombridae	<u>Thunnus</u>	<u>Thunnus alalunga</u>	Atún
Salmonidae	<u>Salmo</u>	<u>Salmo salar</u>	Salmón atlántico
		<u>Salmo trutta</u>	Trucha marrón
Salmonidae	<u>Oncorhynchus</u>	<u>Oncorhynchus mykiss</u>	Trucha arcoiris
Anguillidae	<u>Anguilla</u>	<u>Anguilla anguilla</u>	Anguila europea
Acipenseridae	<u>Acipenser</u>	<u>Acipenser sturio</u>	Esturión europeo
Petromyzontidae	<u>Petromyzon</u>	<u>Petromyzon marinus</u>	Lamprea

Phasianidae	<u>Gallus</u>	<u>Gallus gallus</u>	Gallina
Phasianidae	<u>Meleagris</u>	<u>Meleagris gallopavo</u>	Pavo
Anatidae	<u>Cairina</u>	<u>Cairina moschata</u>	Pato criollo
Anatidae	<u>Anas</u>	<u>Anas platyrhynchos</u>	Ánade real
Phasianidae	<u>Alectoris</u>	<u>Alectoris phylbyi</u>	Perdiz roja
		<u>Alectoris rufa</u>	Perdiz
Leporidae	<u>Oryctolagus</u>	<u>Oryctolagus cuniculus</u>	Conejo
Bovidae	<u>Ovis</u>	<u>Ovis aries</u>	Oveja
Bovidae	<u>Bos</u>	<u>Bos taurus</u>	Vaca
Suidae	<u>Sus</u>	<u>Sus scrofa domestica</u>	Cerdo
Ranidae	<u>Rana</u>	<u>Rana temporaria</u>	Rana ibérica
Alytidae	<u>Alytes</u>	<u>Alytes obstetricans</u>	Sapo Partero
Alytidae	<u>Discoglossus</u>	<u>Discoglossus galganoi</u>	Sapillo pintojo
Salamandridae	<u>Lissotriton</u>	<u>Lissotriton helveticus</u>	Tritón palmeado
		<u>Lissotriton boscai</u>	Tritón ibérico
Salamandridae	<u>Salamandra</u>	<u>Salamandra salamandra</u>	Salamandra
Bufonidae	<u>Bufo</u>	<u>Bufo bufo</u>	Sapo común
Salamandridae	<u>Mesotriton</u>	<u>Mesotriton alpestris</u>	Tritón alpino

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se vuelven evidentes para aquellos expertos en la materia con el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se presentan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención. Asimismo, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferentes descritas aquí.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de la muestra y extracción del ADN.

10 Muestra fresca

Un mg de tejido fresco fue introducido en un tubo tipo eppendorf con 500µl de resina quelante (10%) y 7µl de Proteinasa K (400 UD/ml). Fue incubado primero a 55°C durante 90 min en agitación y luego fue incubado a 100°C durante 20 minutos para inactivar la encima. El tubo fue almacenado a 4°C o congelado a -20°C para una preservación de largo plazo.

15 Muestra procesada

Diez mg de productos precocinados fueron introducidos en una solución de metanol:cloroformo:agua (2:1:0.8) durante 2 horas; seguido de un lavado en agua destilada y finalmente en tampón PBS 1x. El ADN fue extraído mediante un método de purificación basado en afinidad por carga.

Reacción PCR

20 La reacción PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 40µl, incluyendo tampón 1x (Madison, WI), 2.5mM MgCl₂, 0.25mM dNTPs, 20pmol de cada cebador de la presente invención, a saber, aquellos que se corresponden con las SEQ ID NOs: 1-3, 20ng de ADN molde, y 1 U de Taq ADN polimerasa. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, luego 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación a 61°C durante 20 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos, seguido de una elongación final a

72°C durante 20 min y una post-elongación a 20°C durante 1 min.

Ejemplo 2. Reacción de secuenciación

5 Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con 3µl de 10mg/ml bromuro de etidio. Las bandas teñidas fueron extraídas del gel, el ADN fue purificado con un método de purificación basado en afinidad de carga antes de la reacción de secuenciación. Los productos resultantes fueron purificados usando una precipitación estándar con 2-propanol y re-suspendidos en formamida. Cincuenta nanogramos de ADN fueron secuenciados utilizando 5 picomoles de cada cebador.

10 La secuenciación fue llevada a cabo con un analizador genético siguiendo un método basado en la incorporación de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos utilizando la PCR (basado en el método Sanger). Las secuencias se visualizaron y editaron empleando un software para la visualización de electroferogramas

Ejemplo 3. Identificación de especies mediante comparación de secuencias.

Muestras de control

15 Las secuencias obtenidas de muestras control fueron contrastadas online con aquellas disponibles en GenBank empleando el programa BLAST. Las secuencias obtenidas de las muestras control de las distintas especies utilizadas coincidieron en un 100% de similitud con aquellas recuperadas de GenBank.

Alimentos procesados

Las especies contenidas en todas las muestras frescas y productos comerciales examinados fueron identificadas utilizando los métodos de la presente invención. Las secuencias obtenidas de dichas muestras fueron alineadas con las muestras de control empleando un software de alineamiento múltiple de secuencias..

20 Una coincidencia total (100% de similitud) con las correspondientes secuencias de control permitió identificar las especies presentes en todos los productos analizados. Las secuencias obtenidas de los alimentos procesados fueron entonces contrastadas con GenBank empleando el programa BLAST para confirmar la identificación. Se obtuvo una coincidencia total entre las secuencias obtenidas en las reacciones de secuenciación y aquellas secuencias disponibles en GenBank para todas las especies listadas en la Tabla 1.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* para la identificación a nivel taxonómico de al menos una especie biológica en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
- (a) extracción de ADN de la muestra;
 - (b) amplificación de un segmento del 16s ADNr con los siguientes cebadores:
5 16SH-F (SEQ ID NO: 1): 5´ ATAACACGAGAAGACCCT 3´; y
16SH-R1 (SEQ ID NO: 2): 5´ CCCACGGTCGCCCAAC 3´, y/o,
16SH-R2 (SEQ ID NO: 3): 5´ CCCGCGGTCGCCCAAC 3´
o las secuencias complementarias, o equivalentes de estos cebadores, difiriendo dichos equivalentes en la secuencia de alguno de los cebadores arriba especificados bien por adición o eliminación de cualquiera de sus respectivas extremidades de uno o varios nucleótidos, o por cambio de uno o más nucleótidos dentro de dichas secuencias, o por una combinación de ambos, siempre que dichos equivalentes todavía hibriden con la misma diana de ARN o ADN como los cebadores correspondientes no modificados;
 - (c) secuenciación del fragmento amplificado o fragmentos amplificados; y,
 - (d) comparación de la secuencia obtenida en la reacción de secuenciación del ADN del fragmento o fragmentos amplificados con las secuencias del 16S ADNr presentes en una base de datos.
- 2.- El método según la reivindicación 1, que además comprende la clonación del fragmento amplificado o los fragmentos amplificados y la secuenciación del clon resultante o de cada uno de los clones resultantes.
- 3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra es fresca o procesada.
- 20 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la secuencia del 16S ADNr presente en la base de datos es la secuencia completa o un fragmento de la misma que comprende el fragmento amplificado usando al menos los cebadores correspondientes a las SEQ ID NOs: 1 y 2 y/o 3, o las secuencias complementarias.
- 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra contiene una sola especie o una mezcla heterogénea de especies.
- 25 6.- Un oligonucleótido caracterizado por tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-3, o las secuencias complementarias.
- 7.- Un juego de oligonucleótidos que consiste en un oligonucleótido que tiene la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, o la secuencia complementaria, y en un oligonucleótido que tiene la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o las secuencias complementarias.
- 30 8. Un juego de oligonucleótidos que consiste en los oligonucleótidos que tienen las secuencias correspondientes a las SEQ ID Nos: 1-3, o las secuencias complementarias.
- 9.- Un kit para llevar a cabo los métodos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende los oligonucleótidos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

Fig. 1

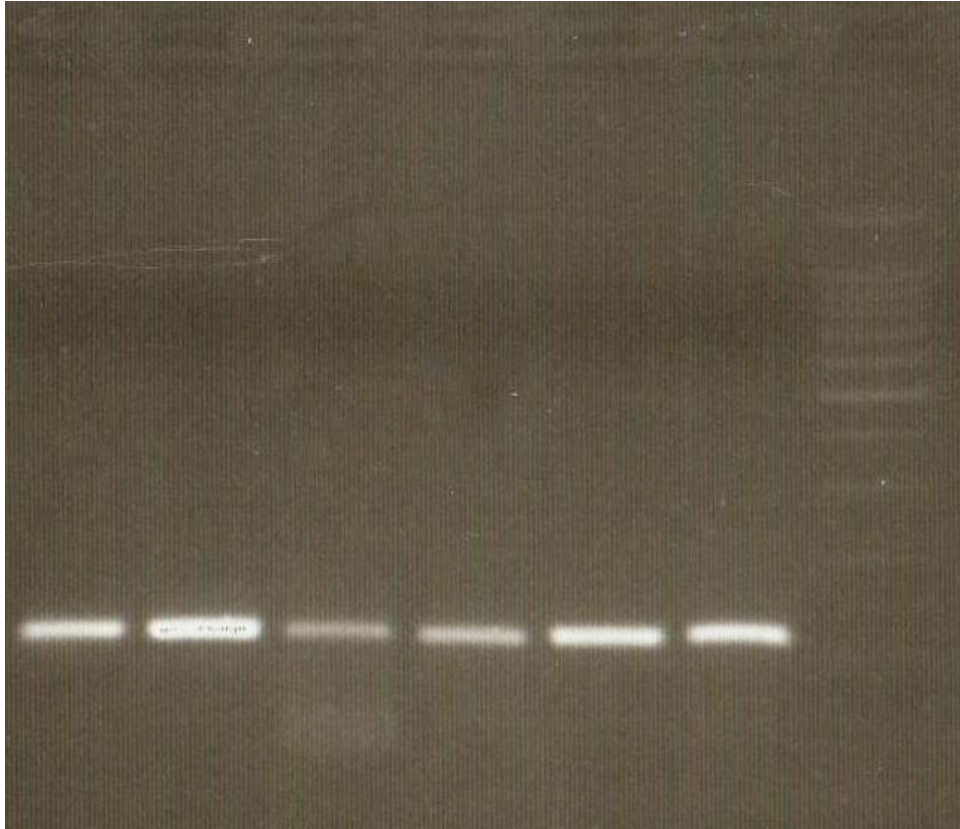


Fig. 2

ACCATGTTCCCAACCCTCCAATAAGAGACTAAA—CTAGTGGTTGCCTTCCCTAATGTCCTTGGTTGGGGCGACCG

Scorpaena notata

ACTACCTTAATTACCCCTGGATAAAGGGCAAAAGCTAAAGGTACCCNTCCCCAGCGTCTTGGTTGGGGCGACCC

Dicentrarchus labrax

ACCACGTTTAATATACTAAAGTTAATAGCAAAACTTAGTGGATGTTTATTAAAGTGTCTTGGTTGGGGCGACCG

Merluccius merluccius

ACCCCG--AAAGCACCTACACCAGGGCCAAA—CAACGTGGTTTTGGCACAACCGTCTTCGGTTGGGGCGACCG

Sardina pilchardus



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031217

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.08.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TELETCHÉA F. et al. "Food and forensic molecular identification: update and challenges" <i>TRENDS in Biotechnology</i> (julio 2005) Vol. 23, páginas 359-366; ISSN 0167-7799; DOI 10.1016/j.tibtech.2005.05.006; todo el documento.	1-9
A	RASMUSSEN R.S. et al. "Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market" <i>Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety</i> (abril 2009) Vol. 8, N.º. 2, páginas 118 - 154; DOI 10.1111/j.1541-4357.2009.00073.x; todo el documento.	1-9
A	FRÉZAL L. et al. "Four years of DNA barcoding: current advances and prospects" <i>Infection, Genetics and Evolution</i> (03 junio 2008) Vol. 8, páginas 727-736; ISSN 1567-1348; DOI 10.1016/j.meegid.2008.05.005; todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
04.10.2012

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBL-EBI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, NPL/EPO, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, XPESP2/ELSEVIER, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TELETCHÉA F. et al. "Food and forensic molecular identification: update and challenges" TRENDS in Biotechnology (julio 2005) Vol. 23, páginas 359-366; ISSN 0167-7799; DOI 10.1016/j.tibtech.2005.05.006.	Julio 2005
D02	RASMUSSEN R.S. et al. "Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market" Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (abril 2009) Vol. 8, N.º. 2, páginas 118-154; DOI 10.1111/j.1541-4357.2009.00073.x.	Abril 2009
D03	FRÉZAL L. et al. "Four years of DNA barcoding: current advances and prospects" Infection, Genetics and Evolution (03 junio 2008) Vol. 8, páginas 727 - 736; ISSN 1567-1348; DOI 10.1016/j.meegid.2008.05.005.	03.06.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-9, es un método para la identificación a nivel taxonómico de al menos una especie biológica en una muestra, basado en la amplificación de un segmento del 16s ADNr con los cebadores 16SH-F, 16SH-R1 y 16SH-R2 o con sus secuencias complementarias (reiv. 1-5). Es también objeto de la invención un oligonucleótido que tiene la secuencia de uno de los cebadores o las secuencias complementarias, un juego de oligonucleótidos que consiste en oligonucleótidos que tienen las secuencias correspondientes a los cebadores o a las secuencias complementarias y un kit con los oligonucleótidos o con el juego de nucleótidos (reiv. 6-9).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga métodos para la identificación de varias especies dentro de una misma muestra, como por ejemplo clonando y secuenciando, PCR, PCR-RFLP o los microarrays de DNA, entre otros. Este documento también divulga distintos marcadores, la mayoría mitocondriales, para la identificación de especies, como el gen que codifica para el citocromo b, el 12S, el 16S, el D-loop, el gen que codifica para la citocromo c oxidasa II (COX2) y marcadores nucleares como los microsátélites. Sin embargo, en este documento se indica que cada técnica y cada marcador son específicos para determinadas especies, por ejemplo, el marcador 16S rDNA se usa para la identificación de carnes de rumiantes, aves, peces y cerdo.

El documento D02 divulga métodos basados en el DNA para la identificación de especies de peces y mariscos en productos comerciales. En este documento se divulgan tanto los métodos utilizados como los marcadores que se utilizan en cada uno de ellos. Sin embargo, al igual que en el documento anterior, en este documento se indica que cada técnica y cada marcador son específicos para determinadas especies, por ejemplo, el marcador 16S rDNA mitocondrial se usa para la identificación de pequeños peces pelágicos de los órdenes Clupeiformes y Salmoniformes, mediante el método de secuenciación y análisis filogenético (tabla 7); y para la identificación de algunas especies de esturiones, mediante PCR con primers específicos para cada especie (tabla 8).

El documento D03 divulga la identificación, a nivel molecular, de especies utilizando la técnica del "barcoding", que se basa en la utilización del gen de la citocromo c oxidasa 1 (COI) como marcador universal.

Aunque en los documentos citados, que en cierta medida son un resumen de los métodos (concretamente de PCR) y cebadores que se están utilizando para la identificación de distintas especies, se divulgan distintos cebadores y primers, en ellos no se divulgan los cebadores de la invención. Además, con los cebadores divulgados en estos documentos tampoco es posible la identificación de todas las especies que se proponen en la memoria de la solicitud.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-9. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-9. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-9 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).