



Universidad  
de Zaragoza



Facultad  
de Veterinaria



Memoria presentada por  
D. Jorge Hugo Calvo Lacosta  
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria  
Zaragoza. 2000.

**Facultad de  
Veterinaria**



**Universidad  
de Zaragoza**

***Estudio de la calidad  
alimentaria mediante  
marcadores genéticos:  
genes candidatos y  
autenticación de  
productos alimenticios***

**Memoria presentada por  
D. Jorge Hugo Calvo Lacosta  
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria  
Zaragoza.2000.**

**Bodegón de la portada de Paul Gauguin.**

**Facultad de  
Veterinaria**

**Universidad  
de Zaragoza**

***Food quality studies  
by using genetic  
markers: putative  
genes and food  
authenticity***



**Thesis presented by:  
Mr. Jorge Hugo Calvo Lacosta  
to apply for the Veterinarian Ph.D degree  
Zaragoza, 2000.**



*Laboratorio de Genética  
Bioquímica.*

*Departamento de Anatomía,  
Embriología y Genética  
Facultad de Veterinaria.  
Universidad de Zaragoza.*



Dña. PILAR ZARAGOZA FENÁNDEZ, Catedrática de Genética y Dña. ROSARIO OSTA PINZOLAS, Profesor ayudante, en el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Estudio de la calidad alimentaria mediante marcadores genéticos: genes candidatos y autenticación de productos alimenticios" que se recoge en la presente Memoria, de la que es autor D. Jorge Hugo Calvo Lacosta, ha sido realizada bajo nuestra dirección desde el año 1997, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y cumple las condiciones exigidas para que su autor pueda optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Lo que subscriben como directoras del trabajo, en Zaragoza a 6 de Junio de 2000.

Fdo. Pilar Zaragoza Fernández

Fdo. Rosario Osta Pinzolas



**A mis padres y mi  
hermano David**

**A Yoli**



## AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

“Existe una paradoja en el desarrollo de los conocimientos científicos. A medida que la información se va acumulando en cantidades cada vez mayores, los hechos inconexos y los misterios impenetrables pueden sustituirse por explicaciones racionales, y del caos surge la simplicidad”. De esta forma, me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo, tanto por su colaboración, apoyo, ayuda y cariño, y por ende en el desarrollo de los conocimientos científicos. Gracias a todos.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directoras, Pilar y Charo (alias “patenteitor”), por la confianza y apoyo mostrado durante la realización de este trabajo, tanto a nivel profesional como personal. Gracias.

A Clemen, por su ayuda y predisposición a “discutir de ciencia”, y de ciclismo.

A D.Isaias, por el ejemplo que predica y su forma de actuar.

A Emilio, por sus enseñanzas en el laboratorio, y sus consejos tanto a nivel profesional como personal. Por supuesto nunca olvidaré nuestras estancias en Lorca.

A Carmen y Mamen, por su ayuda y consejos en el momento que lo he necesitado, es decir molaridades, formulación de distintos componentes...y por su paciencia (...“y vermut”).

A Inma por su apoyo y su ayuda en todo momento, y por defenderme de tanto merengue que hay en el laboratorio.

A Txori por sus consejos, y por lo fácil que es reirse con él.

A Rosa por la tranquilidad que te transmite con su forma de ser..., y por supuesto porque siempre está allí para lo que la necesites. A Javier, de

farmacogenética, porque ya sabe pescar con caña, por su ayuda con los ordenadores, y por esas charlas tan relajantes en la piscina.

A Eva (la Marquesa de Osea), que a pesar de ser oscense, siempre está dispuesta a echar una mano y tomar un café, y a Jesús que siempre nos ameniza con sus increíbles historias. Los dos han traído un soplo de aire fresco al laboratorio.

A Sagrario, por sus consejos, y cafés.

A M<sup>a</sup>Jesús, por sus consejos a nivel personal y su alegría. Lo siento pero esta hoja no está patrocinada por Nike.

A Antonio, Paco, Carmen Elduque, Pilar Aznar, Yolanda, Pilar Naya, Joaquín Medina, Manolo Gascón, Nacho, Salvador,...y a todas esas personas que me han ayudado y aconsejado. Gracias a todos.

A Denis Milan, del Laboratoire de Genetique Cellulaire del INRA de Toulouse, por haberme acogido en su grupo. También quiero agradecer la amabilidad de todas las personas que conocí en Toulouse, Annie Robic, Martinne Yerle, Jöel Gellin...y en especial de Nathalie, que gracias a su medio español y a mi medio francés pude aprender muchas cosas.

Quiero también agradecer a Alan Archibald, del Roslin Institute en Edimburgo, por haberme acogido en su grupo, amabilidad, ayuda y paciencia con mi inglés. Thank you very much Alan. No quiero olvidarme de la amabilidad y ayuda de las personas del Roslin: Tom, Bryan, Susan.... Gracias a Ray por su acogida y cariño, sin olvidarme de sus consejos y de nuestras charlas nocturnas. Gracias a Sergio alias "captain harpoon", que siempre está dispuesto a tomar algo. A Juan Carlos con el que hice turismo religioso. No puedo olvidarme de Miguel, un gran amigo, con el cual conocí Escocia, y compartí cafés en Edimburgo. Y para el final he dejado a Nestor, o Don Nestor Luis, gracias por todo y en especial por tu amistad, ayuda y consejos tanto a nivel profesional como personal. Al

final sobrevivimos en nuestras aventuras por las Highlands e Irlanda, eso sí, la próxima vez el aceite del coche lo llevo yo.

A Tomás, Javier, Leticia, Mónica, Eduardo, Ana, Chema, Nuria, Victor, Maribel, Mariano, Andrés, Francisco...por aguantar mis charlas de genética.

A Yoli, por soportar mis interesantísimas charlas de genética, y por tener siempre una sonrisa en el momento oportuno. Te doy un 10.

A mis padres y mi hermano David, por apoyarme y ayudarme en todo momento y por supuesto por su cariño. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

**GRACIAS A TODOS.**



**INDICE**

<b><u>INDICE</u></b>	i
<b><u>RESUMEN</u></b>	ix
<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	xv
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN.</u></b>	1
<b>1.1. PRESENTACIÓN DEL TEMA.</b>	3
<b>1.2. OBJETIVOS.</b>	5
<b>2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</u></b>	7
<b>2.1. AUTENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS.</b>	10
<b>2.1.1. <u>Autenticación de la carne y productos cárnicos.</u></b>	12
<b>2.1.1.1. Identificación de especie que compone la carne y los productos cárnicos.</b>	13
<i>2.1.1.1.1. Métodos microscópicos.</i>	14
<i>2.1.1.1.2. Métodos basados en el análisis químico.</i>	14
<i>2.1.1.1.3. Métodos electroforéticos.</i>	15
<i>2.1.1.1.4. Métodos inmunológicos.</i>	17
<i>2.1.1.1.5. Métodos basados en el análisis del ADN.</i>	24
<b>2.1.1.2. Detección de proteínas no cáncas en productos cárnicos.</b>	35
<i>2.1.1.2.1. Detección de proteína de soja.</i>	35
<i>2.1.1.2.2. Detección de otras proteínas.</i>	36
<b>2.1.1.3. Detección de carne recuperada mecánicamente.</b>	39
<b>2.1.2. <u>Autenticación de la leche y quesos.</u></b>	41



---

<b>2.2. BÚSQUEDA DE REGIONES REPETIDAS EN EL GENOMA ESPECIE-ESPECÍFICAS.</b>	44
<b>2.3. CANTIDAD Y CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS EN LA ESPECIE PORCINA.</b>	49
<b>2.3.1. <u>QTL/ETL en la especie porcina.</u></b>	52
<b>2.3.1.1. Acetil-CoA carboxilasa <math>\alpha</math> (ACACA).</b>	57
2.3.1.1.1. <i>Bioquímica de la ACACA.</i>	57
2.3.1.1.2. <i>Genética de la ACACA.</i>	61
<b>2.3.1.2. Maltasa glucoamilasa (MGAM).</b>	68
2.3.1.2.1. <i>Bioquímica de la MGAM.</i>	68
2.3.1.2.2. <i>Genética de la MGAM.</i>	71
<b>2.3.1.3. Proteína quinasa 98 (ppk98).</b>	71
2.3.1.3.1. <i>Bioquímica de la ppk98.</i>	71
2.3.1.3.2. <i>Genética de la ppk98.</i>	73
<b>3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	75
<b>3.1. AUTENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS</b>	77
<b>3.1.1. <u>Detección y caracterización genética de nuevos marcadores</u></b>	77
<b>3.1.1.1. Aislamiento de secuencias repetidas mediante el método I.R.A.R.S. (Manuscrito 1, patente 1).</b>	77
<b>3.1.1.2. Caracterización genética de los marcadores obtenidos.</b>	80
<b>3.1.1.3. Cartografía de los marcadores obtenidos.</b>	81
3.1.1.3.1. <i>Mapeo físico por híbridos somáticos.</i>	81
3.1.1.3.2. <i>Mapeo físico por hibridación in situ fluorescente.</i>	82

3.1.1.3.3. <i>Mapeo genético.</i>	88
3.1.2. <u>Identificación de especie que componen productos cárnicos (manuscrito 3, manuscrito 4).</u>	95
3.1.3. <u>Autenticación en quesos y patés (manuscrito 5 y 6).</u>	96
3.2. CANTIDAD Y CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS.	96
3.2.1. <u>Estudio del posible QTL/ETL en la ACACA y la MGAM.</u>	96
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	99
4.1. AUTENTICACIÓN DE LOS ALIMENTOS.	101
4.2. CANTIDAD Y CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS.	103
4.3. MANUSCRITOS DEL APARTADO DE AUTENTIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS.	107
4.3.1. MANUSCRITO 1: Método de búsqueda de marcadores de ADN altamente repetidos en el genoma mediante amplificación al azar (P200000838 Patente 1).	109
Anexo 1	134
4.3.2. MANUSCRITO 2: Isolation, mapping and characterization of three porcine microsatellites (Artículo 1).	141
Anexo 2	150
4.3.3. MANUSCRITO 3: Región de ADN específica de la especie porcina y procedimiento de detección de la misma en productos alimenticios (P9902520 Patente 2).	157
Anexo 3	193

<b>4.3.4. MANUSCRITO 4: A Quick and More Sensitive Method to Identify Pig in Processed and Unprocessed Food by PCR Amplification of a New Specific DNA Fragment (Artículo 2).</b>	195
<b>4.3.5. MANUSCRITO 5: DNA Fingerprinting for Detection of Bovine, Ovine and Caprine Cheese (Artículo 3).</b>	215
<b>4.3.6. MANUSCRITO 6: Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints for Identification of Pâté Poultry Species (Artículo 4).</b>	233
<b>4.4. MANUSCRITOS DEL APARTADO DE LA CANTIDAD Y CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS.</b>	251
<b>4.4.1. MANUSCRITO 7: Assignment* of acetyl- coenzyme A carboxylase <math>\alpha</math> (ACACA) to pig chromosome 12 by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping (Artículo 5).</b>	253
<b>Anexo 7</b>	259
<b>4.4.2. MANUSCRITO 8: Assignment* of maltase glucoamylase (MGAM) to pig chromosome 2 by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping (Artículo 6).</b>	265
<b>Anexo 8</b>	271
<b>4.4.3. MANUSCRITO 9: Assignment* of PPK98 (TRA1) to pig chromosome 5 by fluorescence in situ hybridization and confirmation by somatic cell hybrid analysis.(Artículo 7).</b>	275
<b>Anexo 9</b>	281

---

5. <u>CONCLUSIONES.</u>	283
6. <u>BIBLIOGRAFÍA.</u>	289



## **RESUMEN (SUMMARY)**

## RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado el estudio de la calidad de los alimentos desde dos puntos de vista. Por un lado, se ha procedido a la autenticación de los alimentos, desarrollando métodos que nos permitan la identificación de especies en distintos productos alimenticios como medio de autenticación de los componentes. En segundo lugar, se han estudiado genes que pueden tener influencia en la calidad de los alimentos, y más concretamente en la carne de porcino.

Con relación a la identificación de especies en los alimentos se ha desarrollado una técnica, que se ha denominado I.R.A.R.S. (Intensive Random Amplification of Repetitive Sequence), mediante la cual es posible aislar fragmentos de ADN altamente repetidos en el genoma, que pueden ser utilizados como sondas específicas de especie. Esta técnica fue aplicada en porcino, aislando tres microsatélites polimórficos, s0614, s0615 y s0616, localizados físicamente y genéticamente en los cromosomas porcinos SCC8, SCC1 y SCC1 respectivamente, y un gran número de secuencias con motivos de repetición que no han sido estudiadas hasta el momento. Una de estas secuencias aisladas ha resultado ser específica de porcino permitiendo detectar, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) carne de cerdo cruda y tratada térmicamente (autoclavada), en patés, salchichas, mortadela y otros productos que pueden contenerla. La sensibilidad de la técnica es muy elevada, detectando hasta 1.25 pg de ADN que se corresponden con un 0.005% de carne de cerdo en vaca. El mismo porcentaje de contaminación se detecta en patés supuestamente de pato.

Tomando como base esta técnica se ha desarrollado un procedimiento para cuantificar el porcentaje de carne porcina en un producto alimenticio obteniendo un error máximo del 3%.

Dentro de la identificación de especie en determinados productos alimenticios se ha desarrollado igualmente un procedimiento para detectar la composición de especie en quesos y patés mediante la técnica RAPD-PCR, siendo posible detectar mediante un único PCR hasta 25 pg de ADN en mezclas de quesos de bovino, caprino y ovino, y 250 pg en mezclas de paté de cerdo, pato y pollo.

Con relación a la cantidad y calidad intrínseca de los alimentos, se han aislado y estudiado fragmentos de ADN pertenecientes a la acetil-CoA carboxilasa y la maltasa-glucoamilasa por ser genes relacionados con el metabolismo de las grasas y Kg de carne producidos respectivamente. Tras la localización de los mismos en librerías de BACs, se han localizado físicamente mediante FISH en los cromosomas SSC12 en el caso de la acetil-CoA carboxilasa y SSC2 en el caso de la maltasa glucoamilasa. En este segundo gen, su asignamiento al cromosoma 2 porcino ha permitido clarificar un punto de ruptura de la conservación del grupo de sintenia, en el que se localiza la maltasa glucoamilasa, con el cromosoma humano HSA7, contribuyendo de forma importante a la cartografía comparativa entre las especies porcina y humana.

El aislamiento de dos microsatélites polimórficos a partir de los BACs para estos genes, ha permitido realizar el mapeo genético que ha confirmado los resultados obtenidos del mapeo físico. Por otra parte, este análisis nos permitió ordenar y conocer la distancia de estos genes a otros marcadores dentro del cromosoma correspondiente.

Por último, se ha estudiado el gen *ppk98* (*TRA1*) relacionado con resistencia a estrés celular y por lo tanto calidad del alimento, realizándose la cartografía física del mismo, mapeándolo en el cromosoma porcino SSC5. Este asignamiento refuerza la hipótesis de que *ppk98* es *TRA1*, ya que el gen *TRA1* humano está localizado en el

cromosoma HSA7, y por mapeo comparativo la zona dónde está localizado el gen corresponde con el cromosoma porcino SSC5.

## **SUMMARY**

In the present work, food quality has been studied. On the one hand species identification has been performed in food. On the other hand three genes, which may have influence in food quantity and quality, have been studied.

Isolation of a new DNA specific porcine repetitive element, three new pig microsatellites (s0614, s0615 y s0616), and a lot of new porcine sequences with repetitive elements have been isolated by I.R.A.R.S. (Interisive random amplification of repetitive sequences). s0614, s0615 and s0616 were physically assigned to SSC8, SCC1 y SSC1 respectively.

A PCR procedure using the new DNA specific porcine repetitive element has been developed and evaluated to detect pork in heated and not heated meat, sausages, tinned food, cured products and pâtés, using a faster, more specific and sensitive method than others previously described. The amount of pig DNA detected was 1.25 pg, detecting up to 0.005% pork in beef and duck pâté.

Using this method pork degree contamination can quantify, with a low desviation (3%).

Species identification has been also carried out in cheeses and pâtés by using the randomly amplified polymorphic DNA – PCR (RAPD-PCR) method. RAPD-PCR pattern was useful to identify species composition: cattle, ovine and caprine in cheese and chicken, duck, turkey, goose and pig in pâtés, detecting an amount of DNA up to 25 and 250 pg in cheese and pâtés species respectively.

On the other hand, genes can have some influence in food quantity and quality. In this way, Acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  (ACACA), maltase glucoamylase (MGAM) and porcine proteinkinase 98 (ppk98) genes have been studied. ACACA and MGAM DNA fragments have been isolated and studied. BACs have been isolated using these DNA fragments for FISH experiments. ACACA and MGAM were physically assigned by FISH to SSC12 y SSC2 respectively. MGAM assignment showed an evolutionary breakpoint (HSA7) on SSC2.

Microsatellite markers were isolated from BACs for ACACA and MGAM. Linkage analysis confirmed the boundary position of these genes.

Finally, ppk98 (TRA1) was assigned by FISH on SSC5. This assignment supports the hypothesis ppk98 is TRA1 gene in human, since human and rat TRA1 should map in SSC5 by comparative mapping.

## **ABREVIATURAS**

**ABREVIATURAS**

- ADN: Ácido deoxiribonucleico.
- AMP: Adenosín monofosfato.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.
- ARYCPC: Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- BAC: Cromosoma artificial de bacterias.
- BPF: Buenas Prácticas de Fabricación.
- DFD: Canales duras, secas y exudativas.
- dNTP: Nucleósido trifosfato.
- EDTA: Ácido etilendiamino tetracético.
- ELISA: "enzyme-linked immunosorbent assay".
- ETL: "Economic trait loci". Loci relacionados con caracteres de interés económico.
- FISH: Hibridación *in situ* fluorescente.
- g (mg, µg, ng): gramo( mili, micro y nanogramo).
- GATT: Acuerdo General sobre Aranceles y Comercio.
- h (min,s): hora (minuto, segundo).
- HPLC: Cromatografía líquida de proteínas.
- HSA: Homo sapiens. Siglas utilizadas para designar a los cromosomas humanos.
- I.N.R.A.: Institut National de la Recherche Agronomique
- l (ml, µl): litro (mili y microlitro).
- LINE (L1): Elemento nuclear disperso largo.
- M (µM): molar (micromolar).
- m/m: masa/masa.
- MAS: Selección asistida por marcadores.

- MER: Elementos repetidos dispersos de mamíferos.
- MIR: secuencias de reiteración de frecuencia media.
- MMU: *Mus musculus*. Siglas utilizadas para designar a los cromosomas de ratón.
- Mol (pmol): mol (picomol).
- MRM: Carnes recuperadas mecánicamente.
- MULTI-SIFT: Test de identificación de campo multi-especies.
- NADH: nicotinamín-adenín dinucleótido.
- NADPH: nicotinamín-adenín dinucleótido fosfato.
- ORBIT: Test rápido de identificación de bovino en una noche.
- pb (kb, Mb): pares de bases (kilobase, megabase).
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- PIC: Contenido de información polimórfica.
- PRIME: Método rápido de identificación porcina.
- PROFIT: Test rápido de identificación de aves en una noche.
- QTL: "Quantitative trait loci". Loci relacionados con caracteres cuantitativos de interés económico.
- RAPD: Polimorfismos del ADN amplificados al azar.
- RFLPs: Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de restricción.
- SDS: Dodecil sulfato de sodio.
- SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio.
- SINE: Elemento nuclear disperso corto.
- SOFT: Test serológico ovino de campo.
- SSC: Tampón utilizado en los lavados de los filtros tras la hibridación.
- SSC: *Sus scrofa*. Siglas utilizadas para designar a los cromosomas porcinos.
- STR: microsatélites.

- TEMED: Tetrametiletilendiamino..
- V: Voltios.

Los símbolos que representan los genes nombrados en este trabajo, son los mismos que los utilizados por los genes homólogos en la especie humana, tal y como están descritos en la base de datos GDB (Genome Database). Asimismo, los marcadores microsatélites se han designado siguiendo la nomenclatura de la base de datos del PiGMaP.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## I-INTRODUCCION.

### 1.1.PRESENTACIÓN DEL TEMA.

En los últimos años ha habido un enorme aumento en el consumo de productos alimenticios de alta calidad, y una fuerte demanda de estos productos por parte del consumidor. La calidad de un alimento, manufacturado o no, se puede considerar desde dos puntos de vista:

**1. Autenticidad de los componentes de los alimentos**, de forma que el etiquetado de estos productos corresponda con la composición real del producto (patés, quesos, hamburguesas, etc.). En la actualidad, resulta de gran interés la detección de las especies que componen dichos productos, para detectar posibles fraudes, tanto en productos animales y/o vegetales.

En el caso de productos animales, uno de estos fraudes podría consistir en realizar un producto elaborado sin mencionar en la etiqueta que parte del mismo está confeccionado por determinados productos bases (carne de cerdo y no de ave; leche de vaca y no de cabra). Este fraude es especialmente importante en el caso de la especie porcina, ya que existen determinados sectores de la población que por razones religiosas (religión Judía y Árabe entre otras) necesitan tener la seguridad de que los alimentos que ellos consumen no poseen en su composición carne de cerdo. Un caso similar sería los productos preparados para los vegetarianos en los que pueden existir componentes animales sin estar nombrados en la etiqueta.

Ante estas situaciones se han desarrollado una serie de técnicas para identificar las distintas especies animales presentes en un producto. La utilización de algunas de las técnicas actuales presentan el problema de ser lentas y caras, bien por el equipo del que hace falta disponer, o porque no se pueden aplicar a productos que no hayan sido sometidos a

algún tratamiento térmico u otros tipos de procesado, como por ejemplo curados. Para evitar estos problemas en la actualidad se están poniendo a punto técnicas basadas en el análisis del ADN, con la finalidad de desarrollar métodos más sensibles, y aplicables a cualquier producto. Por tanto, resulta de gran interés el estudio de nuevos fragmentos del ADN que sean fácilmente detectables, específicos de especie, y aplicables a cualquier producto alimenticio (quesos, patés, embutidos, etc.).

Con relación a los productos vegetales, un fraude podría ser la introducción de una especie vegetal por otra en un producto alimenticio y no mencionarlo en el etiquetado, o introducir en un alimento componentes no vegetales o animales en su composición, en un producto típicamente animal o vegetal. Un ejemplo claro de este tipo de fraude fue la intoxicación producida por aceite de colza, que además produjo un atentado serio contra la salud.

**2. Cantidad y calidad intrínseca de los alimentos de origen porcino**, entendiendo como tal, la cantidad de grasa intramuscular e intermuscular de la carne, la cantidad de magro, y otros caracteres de calidad y productivos. A este respecto, es importante indicar que el 40% del total de las carnes consumidas por la población mundial es de porcino. No obstante, el estancamiento de la demanda por parte de los países desarrollados, orienta la producción hacia una mayor calidad de carne en lugar de cantidad. La calidad y cantidad de la carne tienen un componente genético de naturaleza cuantitativa, es decir, están controlados por un número elevado de genes. Estos genes y/o sus marcadores se han denominado QTLs (quantitative trait loci) o ETLs (economic trait loci). El conocimiento de los mismos, puede ser utilizado en selección animal (programas MAS o selección asistida por marcadores) de forma que un determinado genotipo favorezca algún carácter de calidad (cantidad de magro, cantidad de grasa extra e intracelular, etc.), o algún carácter productivo (crecimiento diario, número de lechones vivos/parto, etc.). Por

estos motivos es importante el estudio de genes candidatos no estudiados hasta el momento en la especie porcina. En nuestro caso concreto hemos centrado nuestro trabajo en los genes ACACA (acetil-CoA carboxilasa A), MGAM (maltasa-glucoamilasa) y ppk98 (proteína quinasa porcina 98).

Por lo tanto, según los dos aspectos expuestos, resulta de gran importancia la detección de las especies que componen los alimentos, para detectar posibles fraudes, o fallos en el etiquetado. Por este motivo, planteamos en la presente memoria el estudio de nuevos marcadores de ADN específicos de especie, que sean aplicables a un gran número de productos alimenticios como patés, embutidos, quesos, carne, etc.

El segundo aspecto de gran importancia es el estudio de genes que estén relacionados con caracteres de calidad en los alimentos (% de grasa intramuscular), y cantidad (Kg de carne). Por este motivo se han estudiado los genes ACACA, MGAM, y PPK98. La enzima acetil-CoA carboxilasa tiene un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos, pudiendo tener por ello influencia en la cantidad de grasa intra e intermuscular. La maltasa glucoamilasa, la cual interviene en la digestión de compuestos almidonados, y puede presentar una relación con crecimiento diario y por lo tanto con Kg de carne al sacrificio. Por último, la ppk98 es una enzima que presenta un gran número de funciones y que se ha relacionado con el estrés celular, que puede producir una disminución de la calidad de los alimentos.

## **1.2. OBJETIVOS.**

Tras los antecedentes expuestos los objetivos que se pretenden conseguir en la presente memoria de Tesis Doctoral se engloban dentro de dos grandes objetivos generales:

1. Autenticación de alimentos, concretamente identificación de las especies que componen los productos alimenticios, utilizando la tecnología del ADN. Este objetivo, puede dividirse en dos objetivos parciales:

1.1. Desarrollo de una técnica de aislamiento de marcadores polimórficos, altamente repetidos en el genoma, que nos permita utilizar alguno de los marcadores aislados como sonda específica de la especie porcina y testar gran número de alimentos.

1.2. Diferenciación de especies próximas en la escala evolutiva como son los rumiantes, y las aves. Para este objetivo se plantea la utilización de la técnica RAPD-PCR, dadas las características de la misma. Una vez conocido los marcadores y métodos más adecuados se podrían identificar las especies presentes en los distintos alimentos, siendo de especial interés los quesos y patés por su posibilidad de fraude.

2. Aislamiento de genes que puedan estar relacionados con caracteres de cantidad y calidad intrínseca de los alimentos o con caracteres productivos, en la especie porcina. Se plantea el estudio de tres genes candidatos:

Acetil-CoA carboxilasa (ACACA). maltasa-glucoamilasa (MGAM) y el gen proteína quinasa 98 porcina (ppk98).

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Cada día son más numerosos los productos que se comercializan, exigiéndoles la máxima calidad al menor precio posible. Por este motivo, son más necesarios los controles que garanticen el mantenimiento de dicha calidad, y el desarrollo de métodos que nos permitan evaluarla. Ante estos antecedentes, en este apartado de Revisión Bibliográfica nos centraremos en las metodologías desarrolladas hasta el momento para garantizar una calidad alta.

En primer lugar describiremos los métodos que se han desarrollado para la identificación de las especies que componen la carne y productos cárnicos, la detección de proteínas no cárnicas y de carne recuperada mecánicamente (MRM), así como la identificación de especies que componen la leche y productos lácteos. Haremos una pequeña descripción de los distintos métodos utilizados hasta el momento, es decir microscópicos, basados en el análisis químico, electroforéticos, inmunológicos, y basados en el estudio del ADN.

En segundo lugar, trataremos de conocer regiones del genoma que pueden ser específicas de especie, describiéndose las secuencias de ADN derivadas de transposición, que se encuentran en regiones no codificantes, y que por ser regiones altamente repetidas están siendo una herramienta fundamental en la genética molecular. Por otra parte, el aislamiento de estos fragmentos de ADN pueden ayudar a completar el mapa genético porcino, ya que dichas secuencias de transposición presentan frecuentemente marcadores polimórficos.

Por último, trataremos el estudio de la calidad de los alimentos mediante el estudio de genes que pueden estar relacionados con caracteres de calidad y de cantidad de los alimentos, centrándonos en la carne de cerdo. Se puede observar que un incremento en la cantidad de kilos de carne producidos por un animal, sin incrementar los costes

variables, puede suponer una disminución del coste del producto con la misma calidad del mismo. Por otra parte, caracteres como grasa intramuscular, etc., influyen en la calidad de la carne. Por este motivo, describiremos los QTLs/ETLs estudiados hasta el momento en porcino, para finalizar, con los genes objeto de este estudio: la acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$  (ACACA), maltasa glucoamilasa (MGAM) y proteína quinasa 98 porcina (ppk98). Dicho estudio se dividirá en las funciones fisiológicas, bioquímica y genética de dichas enzimas.

## **2.1. AUTENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS PRODUCTOS ALIMENTÍCEOS.**

El desarrollo industrial y económico de un país lleva consigo un incremento en el sector terciario, y con ello en la transformación de los productos agrícola-ganaderos y la forma de presentación de los distintos alimentos. Por lo tanto, en la actualidad la industria alimentaria y todos los campos relacionados con la misma están incrementando su importancia. A esta situación hay que añadir la exigencia, por parte de los consumidores, de una mejor presentación de los productos elaborados y de los frescos (conservas, ahumados, productos semielaborados...) además de una máxima seguridad higiénica. Esta máxima seguridad conlleva una calidad más alta de los productos que se demandan por parte del mercado. Para finalizar, los consumidores exigen, cada vez más, la autenticidad de los alimentos que van a consumir, de forma que el origen y etiquetado de estos productos corresponda con la composición del producto (patés, quesos, hamburguesas, etc.).

Debido a estas exigencias se han implantado nuevos sistemas para controlar la calidad de estos alimentos, y asegurar que no representen ningún riesgo para la salud. En 1992 la UE intenta la aplicación del sistema de actuación integral en toda la cadena alimentaria, haciendo

controles en la misma y tomando medidas adecuadas de forma continuada. En este sentido, con la implantación del sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARYCPC), se opta por el autocontrol en el lugar de origen de los alimentos para asegurar una alta calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, lo que significa una tendencia a una higiene integrada en la propia empresa.

En Europa se siguen lo que se denomina "Buenas Prácticas de Fabricación" (BPF), que son normas específicas para cada sistema de producción de alimentos (sector lácteo, cárnico, restauración...). De esta manera conociendo perfectamente el diagrama de flujo de la fabricación de un determinado alimento, se saben cuales son todos y cada uno de los factores de riesgo que pueden intervenir en esta cadena alimentaria. Conociendo la forma de controlar esos peligros se puede hacer una actuación integrada dirigiendo los esfuerzos hacia esos puntos críticos. De este modo, se realizan medidas preventivas en las distintas fases de producción, realizando la empresa su propio autocontrol, y responsabilizándose de la calidad del producto que obtienen. Sólo en caso de dudas o diversos problemas en las distintas fases de producción se realizará un control "a posteriori" de los distintos alimentos producidos, que garantizarán una máxima calidad de los mismos. En esta fase, se puede proceder a realizar distintas metodologías para garantizar la **autenticidad de los componentes alimenticios**.

Autenticar la calidad de un alimento interesa a todos los eslabones de la cadena de producción. En primer lugar, podemos integrar en el propio sistema de producción de la empresa la autenticación de las especies que componen los productos (Carnegie, 1994), estableciendo inspecciones o controles para conseguir marcas de calidad. Como ejemplo, podemos citar la elaboración de un paté de oca que es susceptible a introducir tejidos de otras especies de menor coste

económico, que no consten en el etiquetado. Si garantizamos un método que indique la composición exacta de dicho paté podemos introducir en el mercado una marca de calidad, ya que garantizamos la autenticidad de los componentes de dicho producto.

Por otra parte, la autenticación de los componentes de los productos alimenticios no sólo interesa a las empresas para garantizar la calidad de sus alimentos, sino que puede contribuir de forma efectiva a resolver la problemática originada con los fraudes cometidos, entre los que se encuentra la adulteración. Esta se produce principalmente, por la sustitución parcial o total de especies de alto valor económico (las cuales vienen indicadas en el etiquetado del producto) por especies de valor económico menor con la consiguiente ganancia económica del infractor.

A continuación pasaremos a comentar la situación actual respecto a la autenticación de carne, leche, quesos y sus derivados.

### **2.1.1. Autenticación de la carne y productos cárnicos.**

La problemática existente en el caso de la autenticación de las carnes y sus productos derivados se enfocará desde 3 puntos de vista:

- Identificación de especies que componen carne y productos cárnicos.
- Detección de proteínas no cárnicas en productos cárnicos.
- Detección de carnes recuperadas mecánicamente (MRM).

### 2.1.1.1. Identificación de especies que compone la carne y productos cárnicos.

Como se ha indicado anteriormente, la espectacular expansión de la producción y el consumo que caracteriza actualmente a las sociedades económicamente desarrolladas ha generado una nueva necesidad: la defensa del consumidor contra los abusos y fraudes derivados del desequilibrio de fuerzas que hay entre consumidores y productores. Como ya hemos señalado, uno de estos fraudes podría consistir en realizar un producto elaborado y no mencionar en la etiqueta que parte del mismo contiene determinados productos denominados bases, como es la carne de ave y cerdo. Este fraude es especialmente importante en el caso de la especie porcina, ya que existen determinados sectores de la población que por razones religiosas (religión judía y árabe entre otras) necesitan tener la seguridad de que los alimentos que ellos consumen no poseen en su composición productos derivados de cerdo. Asimismo, hay que considerar otros grupos de población como vegetarianos, naturistas y determinados grupos de población que presentan alergias a distintos componentes alimenticios, que necesitan conocer la composición exacta del alimento que van a consumir. En cualquier caso, cualquier consumidor tiene derecho a saber los distintos componentes del producto que consume.

En el momento de identificar las especies que componen la carne hemos de hacernos unas preguntas respecto al método de análisis a utilizar:

- 1- ¿Es suficientemente específico y tiene la sensibilidad adecuada?
- 2- ¿Puede aplicarse a carne tratada térmicamente así como a los distintos productos cárnicos?

3- ¿Puede utilizarse para una valoración cuantitativa?.

Una vez revelada la presencia de una o más especies no declaradas, la pregunta sería, ¿qué especies están presentes y en qué cantidad entran a formar parte del alimento?.

En la actualidad se han desarrollado varios métodos que pueden ayudarnos a responder a estas preguntas:

#### *2.1.1.1.1. Métodos microscópicos.*

Uno de los primeros análisis realizados data del año 1978 (Flint y Meech) y fueron realizados por microscopía óptica. A pesar de que este método no permite diferenciar la especie que compone ese alimento, si nos puede sugerir, en el caso de productos cárnicos, cómo se ha preparado ese alimento. Podemos conocer si ese preparado alimenticio ha sido obtenido a partir de músculo completo, de pasta de carne, o bien a partir de carne recuperada mecánicamente, además de conocer si todas las proteínas de la muestra son de origen animal o no. La tinción con azul de Toluidina tras la criosección de un producto alimenticio (Flint y Firth, 1982), permite la diferenciación de cada ingrediente mediante un color distinto, es decir diferencian células musculares, colágeno, elastina y proteínas añadidas (de soja, leche, cereales, etc.). Sin embargo, uno de los problemas que se plantea es que si el producto ha sido elaborado a partir de carne finamente triturada resulta difícil diferenciar los distintos componentes de la muestra alimenticia. Para resolver este problema se han realizado distintas experiencias basadas en anticuerpos que reconocen componentes específicos de la muestra. A pesar de la mejoría, esta técnica no permite diferenciar especies.

#### *2.1.1.1.2. Métodos basados en el análisis químico.*

Los primeros estudios realizados para detectar la composición de especie estaban basados en la composición química de la carne, y más

concretamente en el análisis de lípidos, siendo Payne (1971) el pionero, utilizando el ácido linoleico de la grasa de la carne de équidos. Sin embargo este marcador mostraba falsos negativos dependiendo de la alimentación del équido. Tras la aplicación de la cromatografía capilar gaseosa se logró diferenciar especies de carne como équidos, porcino y canguro, siendo imposible diferenciar mezclas de carne y productos tratados térmicamente (Ashurst y Dennis, 1996). Además, el resultado de análisis de lípidos varía dependiendo de una serie de factores como son la estación del año y la dieta. La solución a este problema es sugerida por Saeed *et al.* (1986), mediante la construcción de una base de datos en donde se recojan la composición de lípidos de la carne de las distintas especies, que tenga en cuenta la estación del año y la dieta, permitiendo la realización del análisis de la especie en casos de sustitución grosera (0-15%) (Saeed *et al.* , 1986).

#### 2.1.1.1.3. Métodos electroforéticos.

Desde 1970, muchos artículos han sido publicados detallando el análisis de la composición de especie de la carne mediante métodos electroforéticos y ensayos inmunológicos (Hitchcock y Crimes, 1985). Los métodos electroforéticos consisten en la separación de proteínas y tinción no específica de proteínas, bien por métodos enzimológicos o inmunológicos (Yman, 1987), siendo utilizado para la identificación de especies en carne cruda. Por ejemplo, mediante isoelectroenfoque y posterior tinción específica de las proteínas de extractos acuosos de carne cruda, Kaiser *et al.* (1980), son capaces de diferenciar vaca, cerdo, pavo, pollo, corzo y venado. Estos autores también sugieren que mediante evaluación densitométrica se permite un análisis cuantitativo de la introducción de una especie en otra hasta un límite de 2-5% (m/m). Slattery y Sinclair (1983), usando un método similar, el perfil de la enzima lactato deshidrogenasa, distinguieron cerdo, vaca, búfalo, caballo y canguro, no pudiendo distinguir oveja y cabra. Sin embargo, estos autores

estudiando los perfiles de las isoenzimas de la esterasa si se consiguieron diferenciar. King y Kurth (1982) combinaron el isoelectroenfoco con la tinción específica de la fosfoglucomutasa para detectar cerdo y búfalo en vaca hasta un límite de 1% (m/m). Por su parte, Kim y Shelef (1986), identificaron una isoenzima y bandas de mioglobina diferenciando mezclas binarias de vaca, cerdo, pollo y pavo hasta un límite de 5% m/m (claras diferenciaciones se sitúan en torno al 25% m/m). Kauffer *et al.* (1990) detectaron carne de pollo mezclada con vaca y cerdo hasta un límite de 25% (m/m), que aumentaba hasta el 10% tras la concentración de las muestras.

Skarpeid *et al.* (1998), identificaron carne de vaca, cerdo y pavo en mezclas de carne mediante isoelectroenfoco en geles en gradiente de pH. Los geles son fotografiados y digitalizados para analizarlos y mediante regresión multivariable se puede determinar la composición de especies de la muestra de carne con un error cercano al 10%.

Sin embargo, las proteínas y enzimas obtenidas de muestras de carne sometidas a tratamiento térmico pierden su actividad desnaturalizándose y degradándose, no pudiendo ser detectadas con isoelectroenfoco. Distintos tratamientos de las proteínas extraídas de carne tratada térmicamente han sido realizados con el fin de recuperar la actividad de las enzimas. King (1984), tras la extracción y dialización de la muestra logró recuperar la actividad de la adenilato quinasa (AK) y la creatín quinasa (cK). Sin embargo la actividad de estas enzimas se pierde cuando se somete la carne a una temperatura entre 120 y 105°C. McCormick *et al.* (1992), estudiaron la creatín quinasa y adenilato quinasa, consiguiendo diferenciar carne cruda de vaca, cabra, caribú, ciervo rojo, ciervo de cola blanca, oveja, cerdo, bisón y alce. Sin embargo, esta técnica presentó la limitación de la desnaturalización de las muestras por encima de 67°C, produciéndose una pérdida de actividad de las proteínas, desapareciendo los perfiles específicos para cada especie.

También se ha combinado el isoelectroenfoque, con la transferencia a membranas de nitrocelulosa y posterior unión a la enzima que hemos transferido de anticuerpos específicos. Con este método se ha podido detectar hasta un 10% m/m de carne de cerdo, caballo, canguro y oveja, en carne de cerdo tratada a 120°C (temperatura interna de la muestra) durante 5 minutos (Janssen *et al.*, 1990).

Otro de los métodos utilizados son técnicas con geles en condiciones denaturantes (Cota-Rivas y Vallejo-Cordoba, 1997, Pineiro *et al.*, 1999). De este modo es posible detectar especies de peces no cocinadas y tratadas térmicamente (a 65 y 85°C). Igualmente es importante mencionar que según los trabajos de Cota-Rivas y Vallejo-Córdoba (1997), utilizando electroforesis capilar en condiciones denaturantes han logrado diferenciar proteínas sarcoplásmicas de carne cruda de cerdo, vaca y pavo.

Otro método utilizado es la cromatografía líquida que se ha aplicado sólo a carne cruda y congelada, permitiendo la diferenciación de carne de vaca, cerdo, oveja, pollo y pato (Ashoor *et al.*, 1990).

#### 2.1.1.1.4. Métodos inmunológicos.

Los ensayos inmunológicos se basan en la utilización de anticuerpos específicos de especie que se unen a proteínas presentes en la carne (Dincer *et al.*, 1987). La inmunodifusión fue el primer método inmunológico usado siendo ideal para la identificación de especie en carne cruda. Anticuerpos contra proteínas específicas de especie localizadas en sangre fueron utilizados para diferenciar las mismas. Gran número de artículos han sido publicados dando detalles de la producción de anticuerpos específicos de especie mediante inmunización de animales utilizando un gran número de antígenos. Hayden (1978), identificó carne de cerdo, caballo, y conejo en carne de vaca hasta 1-3% (m/m). Este mismo autor en 1979, describió la producción de suero con anticuerpos anti mioglobina de porcino, ovino y equino. A pesar de ser un

antígeno termoestable, con el que era posible detectar estas especies en carne cruda y carne tratada térmicamente, se demostró que la fiabilidad de la técnica descendía al aumentar la temperatura de preparación del alimento. Finalmente, fue también Hayden en 1981, quien produjo un inmunosuero de conejo que permitía detectar la carne de caballo, cerdo, cordero y pollo en salchichas cocinadas a una temperatura interna de 71°C. Sin embargo, se observaron reacciones cruzadas entre vaca y oveja, no pudiéndose diferenciar pollo de pavo, siendo la sensibilidad con esta técnica entre un 5 y 10% m/m.

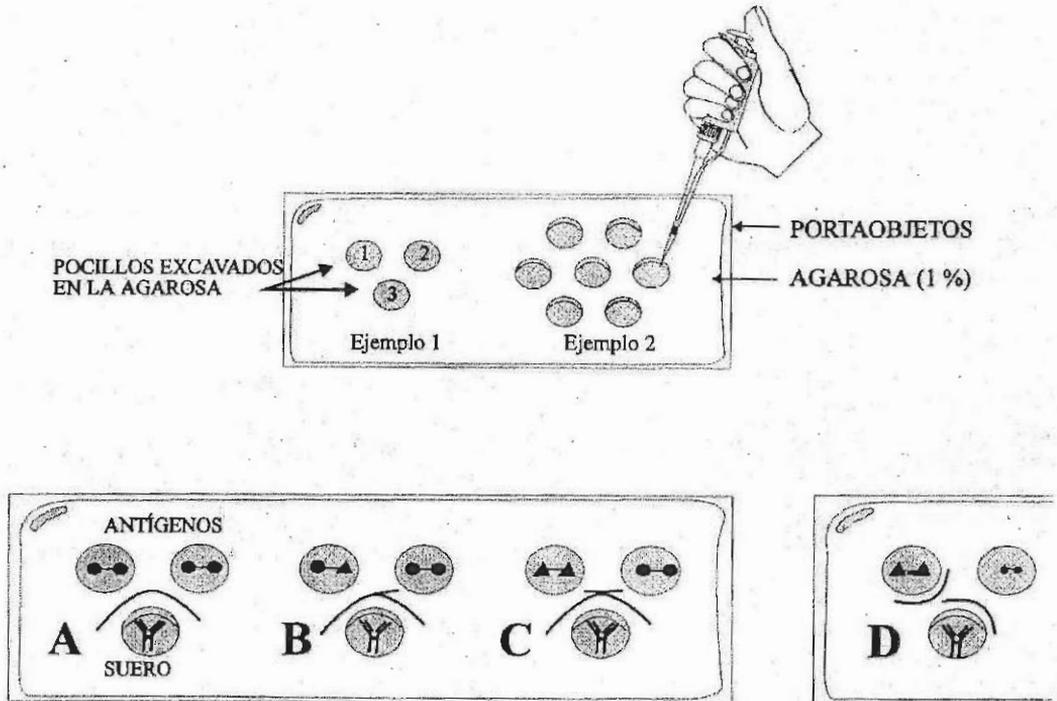
Swart y Wilks (1982), utilizaron este método, diferenciando carne de vaca, cerdo, caballo, pollo, oveja y canguro, no pudiendo diferenciar oveja de cabra. Los límites de detección en carne cruda de vaca son 5% de oveja, 10% de cerdo y caballo, 15% de pollo y pavo. Un 2% de carne de vaca en cerdo puede ser detectado.

Schweiger *et al.* (1983), desarrollaron un antisuero mediante inmunización contra la proteína muscular troponina del pavo. De esta forma se pudo detectar carne de pavo y pollo en carne vaca y cerdo cocinados a temperaturas de 70°C.

Otro método utilizado es el de doble difusión en agar o test de Ouchterlony (véase explicación en la **Figura 1**).

Mageau *et al.* (1984) y Cutrufelli *et al.* (1986, 1987, 1988 y 1989) desarrollaron varios test de campo, fácilmente utilizables en la industria, en los establecimientos de venta, etc. Estos tests consisten en la realización de una inmunodifusión en gel de agar, mediante unos discos de papel de filtro impregnados con anticuerpos específicos de la especie objeto de estudio. Existen test para la detección de bovino, porcino, ovino y carne o productos cárnicos de ave. El ORBIT test (The overnight rapid bovine identification test), es el test utilizado para detectar la especie bovina (suero anti-albúmina bovina).

**Figura 1.** Test de Ouchterlony. En la Figura se puede observar como el suero se enfrenta con dos antígenos (en dos pocillos simétricos). Si estos antígenos son idénticos se formará un único inmunocomplejo y por lo tanto existirá identidad total (A). Si los dos antígenos presentan comunes sólo algunos de los epítopos (reacción cruzada) se formarán dos inmunocomplejos que serán comunes en la mayor parte de sus tramos (B; identidad parcial). Si no presentan ningún epítopo en común las dos bandas se cruzarán (C; no-identidad). Por otra parte un antígeno producirá una línea de precipitación tanto más alejada de su pocillo cuanto menor sea su tamaño molecular (D).



PROFIT (The poultry rapid overnight rapid identification test), es el test utilizado para detectar pollo y pavo (suero anti-albúmina sérica de pollo y pavo). Sus homólogos en la especie porcina es el PRIME (porcine rapid identification method), y SOFT (serological ovine field test) en la especie ovina. Estos test están siendo comercializados por Rhone-Poulenc Diagnostics. Otro test es el MULTI-SIFT (multispecies identification field test), basado en la inmunodifusión en gel de agar, en dónde es posible detectar carne cruda de vaca, cerdo, pollo, oveja y caballo (Cutufelli *et al.*, 1993).

Otro método de diagnóstico es el conocido como "rapid dipstick test" cuya ventaja es la rapidez en la prueba, ya que podemos tener resultados en una hora (Spencer, 1983). En este test los anticuerpos especie-específicos están colocados en una varilla, que actúa de fase sólida. Tras introducir la varilla en el alimento, la reacción positiva es revelada mediante un cambio de color, pudiendo detectar hasta un 1% de carne en una mezcla. Cortecs Diagnostic (UK) ha desarrollado este test para detectar carne de vaca, cerdo, oveja/cabra, pollo/pavo, conejo y canguro.

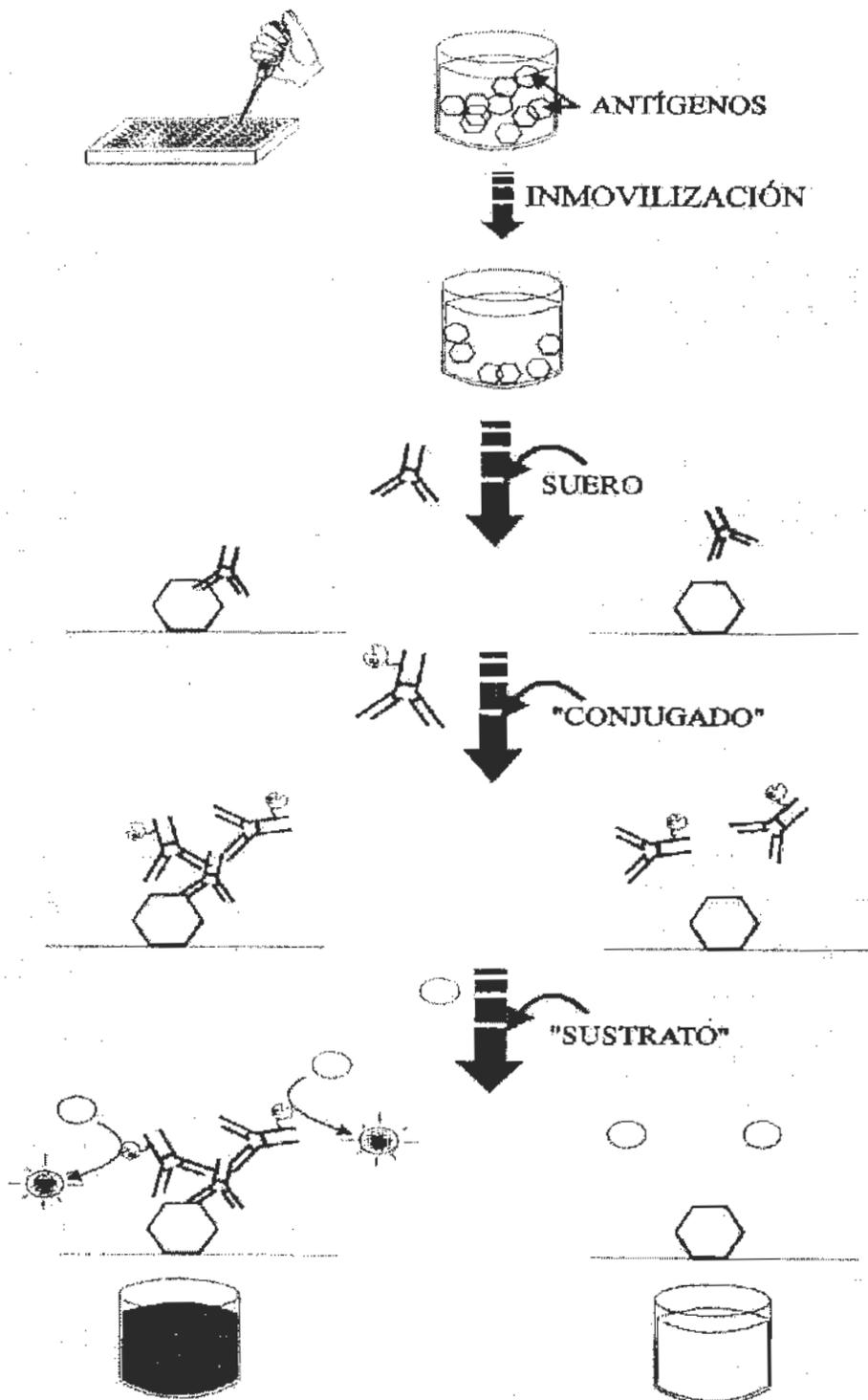
Sin embargo, los métodos de inmunodifusión sólo son aplicables a carne cruda, y sólo detectan proteínas plasmáticas y no las de la carne. La detección de las proteínas del músculo implica que nosotros estamos detectando carne, y no posibles contaminaciones de sangre de otras especies no declaradas en el alimento.

Otro de los métodos inmunológicos utilizado es la técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Como ventajas podemos nombrar que puede aplicarse utilizando menor cantidad de inmunosuero, se obtienen los resultados en pocas horas, numerosas muestras pueden ser procesadas a la vez y en algunos ensayos es posible la cuantificación. No es por tanto extraño, que desde los años 80, se han desarrollado numerosos ensayos utilizando la técnica ELISA para determinar distintas especies en la carne. Muchos han sido diseñados para detectar proteínas plasmáticas los cuales son adecuados para el muestreo rápido de carne cruda, pero no pueden aplicarse a carne cocinada, y además no permiten la cuantificación debido a la contaminación de sangre de otras especies no declaradas en el alimento. Los primeros ensayos utilizando la técnica ELISA fueron realizados por Whittaker *et al.* (1982) y Kang'ethe *et al.* (1982), que usaron inmunosueros contra las albúminas de vaca, oveja, caballo, canguro, cerdo y camello. Kang'ethe *et al.* (1982) detectaron hasta un límite de 3% m/m. Patterson *et al.* (1984) y Patterson y Spencer (1985) fueron capaces de detectar hasta un 1% de carne de distintas

especies en mezclas (diferenciando oveja de cabra, y carne de vaca de búfalo) utilizando un ELISA sándwich. Jones y Patterson (1985), fueron capaces de detectar hasta un 0.5% de carne de cerdo en mezclas de carne con otras especies y en salchichas. Jones y Patterson (1986) y Ayob *et al.* (1989), usaron inmunosueros comerciales específicos para distintas especies (vaca, caballo, cerdo, oveja/cabra). Debido a que con estos test estamos detectando la sangre residual que hay en la carne y en los productos cárnicos, y que esta cantidad puede variar dependiendo de muchos factores, este método no resulta aconsejable para la cuantificación del tipo de contaminación (Griffiths y Billington, 1984, Martin *et al.*, 1988a). Por este motivo, Martin *et al.* (1988a, 1988b) produjeron anticuerpos específicos para proteínas sarcoplásmicas de la carne de porcino y de pollo, detectando en cerdo entre un 1-50% m/m de contaminación. Sin embargo, al intentar cuantificar se encontraron con el problema de que en los extractos sarcoplásmáticos se encuentra sangre y plasma. Para evitar este problema, Martin *et al.* (1991), produjeron anticuerpos monoclonales anti-proteínas sarcoplasmáticas a partir de líneas celulares de hibridomas, llegando a detectar y cuantificar desde 1% hasta 100% de carne de pollo. Otros anticuerpos monoclonales específicos de proteínas musculares de porcino han sido utilizados. (Martin *et al.*, 1992, Morales *et al.*, 1994).

Otra de las técnicas utilizadas es la técnica de ELISA indirecto (véase **Figura 2**) que se ha utilizado para la detección y cuantificación de proteínas de la fibra muscular de ovino en mezclas con vacuno y cerdo (Ashurst y Dennis, 1996).

Figura 2. Esquematización de la realización de un ELISA indirecto.



Los métodos de ELISA descritos hasta ahora están basados en antígenos termolábiles, y por lo tanto sólo pueden ser utilizados en carne no tratada térmicamente. Para solucionar este problema, Berger *et al.* (1988), describieron un complejo y largo proceso para la extracción de antígenos de las fibras musculares de carne de cerdo y pollo. Esta técnica permite la producción de un inmunosuero específico de estas especies, que es específico de carne tratada térmicamente y enlatados. Sin embargo, presentaban el problema de aparecer reacciones cruzadas entre pollo y pavo. A este inconveniente hay que añadir que los antígenos no resultaban termoresistentes en cada uno de los test realizados y además no pueden ser usados para una posible cuantificación.

Otra gran dificultad es la necesidad de realizar complejas extracciones y purificaciones de antígenos termoestables. Además, como se ha comentado anteriormente la termoestabilidad de los anticuerpos no es absoluta, y la especificidad disminuye proporcionalmente al incrementar la temperatura y tiempo de tratamiento térmico.

En el caso de carne de cerdo tratada térmicamente, Patterson y Jones (1989), describieron un ELISA indirecto que produce una respuesta lineal entre la densidad óptica y la cantidad de carne magra de cerdo en carne de vaca, oveja y pollo, permitiendo la detección de un 5% de la misma. Sin embargo, la aparición de una diferencia significativa en la respuesta individual de los distintos tipos de carne podría indicar que la técnica no está valorando únicamente carne de cerdo magra. Por otra parte, esta técnica no fue evaluada respecto a la cuantificación en productos enlatados ni productos cocinados. Para resolver este problema, Sawaya *et al.* (1990), extrajeron antígenos de carne de cerdo con soluciones salinas, y tras autoclavarlos (120°C durante 30 minutos) y filtrarlos, fueron utilizados para inmunizar una oveja. El inmunosuero obtenido es utilizado para realizar un ELISA competitivo, que permite detectar mezclas de carne porcina en bovina y ovina, y en productos cárnicos enlatados. Los

autores afirman que mediante este método puede ser detectado hasta un 2% de carne de cerdo. Sherikar *et al.* (1993), prepararon antígenos termoestables de glándulas adrenales y músculo, triturándolos, sonicándolos y tratándolos a 98°C durante 15 minutos. El inmunosuero obtenido fue testado en carnes cocinadas a 100°C durante 15 minutos, utilizando inmunodifusión, inmunolectroforesis, anticuerpos peroxidasa-antiperoxidas y ELISA. Con los dos primeros métodos se detectó hasta un 10% en mezclas que contenían vaca, búfalo, oveja o cabra y un 5% en las que contienen cerdo. Mediante ELISA y la utilización de anticuerpos peroxidasa-antiperoxidasa se detectó hasta un 1% en todas las especies.

Por último, es interesante el trabajo de Hsieh *et al.* (1998), en el que utilizando proteínas extraídas de carne de cerdo cocinadas a 100°C durante 15 minutos, producen anticuerpos monoclonales, aplicables en carne cocinada de bovino, porcino, ovino, equino, ciervo y ranas, no siendo específico de las aves. Mediante este anticuerpo monoclonal es posible la detección de un 0.5% de carne tratada de cerdo, vaca, oveja y caballo en carne de aves.

Como ya hemos indicado, el mayor problema que presenta la técnica ELISA para muestras tratadas térmicamente es el largo proceso de extracción de antígenos y producción de anticuerpos, que originan que dichos inmunosueros no estén comercializados, por su elevado coste de producción. Otro de sus inconvenientes es que no permiten la cuantificación. Por último, excepto Sawaya *et al.* (1990) que han sido capaces de detectar cerdo en productos autoclavados, la mayoría de los antígenos se desnaturalizan al incrementar la temperatura y el tiempo.

#### 2.1.1.1.5. Métodos basados en el estudio del ADN.

Debido a los problemas encontrados con los métodos expuestos anteriormente se comenzaron a estudiar secuencias de ADN específicas para conseguir mejorar la detección y diferenciación de especies animales

en los alimentos y la cuantificación de los mismos. Los primeros estudios fueron técnicas de Dot-blot (Bauer *et al.*, 1987, Wintero *et al.*, 1990, Chikuni *et al.*, 1990, Ebbehøj y Thomsen, 1991a, 1991b), los cuales comparando sus resultados con las metodologías tradicionales, observaron una mayor sensibilidad de los métodos basados en la tecnología del ADN. Sin embargo, estos autores encontraron como inconveniente la aparición de reacciones cruzadas, ya que usaban ADN genómico que contenían gran cantidad de secuencias repetitivas comunes entre especies filogenéticamente cercanas, en la escala evolutiva.

Chikuni *et al.* (1990), identificaron carne de cerdo, pollo y vaca en carnes tratadas durante 30 minutos a 80, 100 y 120°C, y en producto enlatados, aunque observaron reacciones cruzadas de vaca con ovino y caprino. Ebbehøj y Thomsen (1991b) resolvieron este problema añadiendo ADN sin marcar de las especies que pueden producir dichas reacciones cruzadas. De esta forma, son capaces de diferenciar rumiantes, e incluso ovino y caprino. Hunt *et al.* (1998) mediante la técnica slot-blot consiguieron diferenciar carne de cerdo, vaca, conejo, oveja y cabra. Buntjer *et al.* (1995), utilizaron como sondas ADN satélite específico de las especies a diferenciar. Para este fin, desarrollaron sondas de bovino, ovino/caprino, équidos, ciervo, porcino, pollo y pavo, detectando mezclas de hasta un 1-5%. Estos autores aplicaron este método a carne cruda y a productos cárnicos procesados, y son capaces de diferenciar carne de oveja de cabra. Sin embargo debido a la facilidad y sencillez de la técnica muy pronto la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.*, 1988) fue el método de elección con el fin de detectar fragmentos especie específicos. Meyer *et al.* (1994) amplificaron mediante PCR un fragmento específico, de 108 pares de bases, del gen que codifica la hormona de crecimiento en porcino. Con este método consiguieron diferenciar hasta un 2% de carne de esta especie mezclada

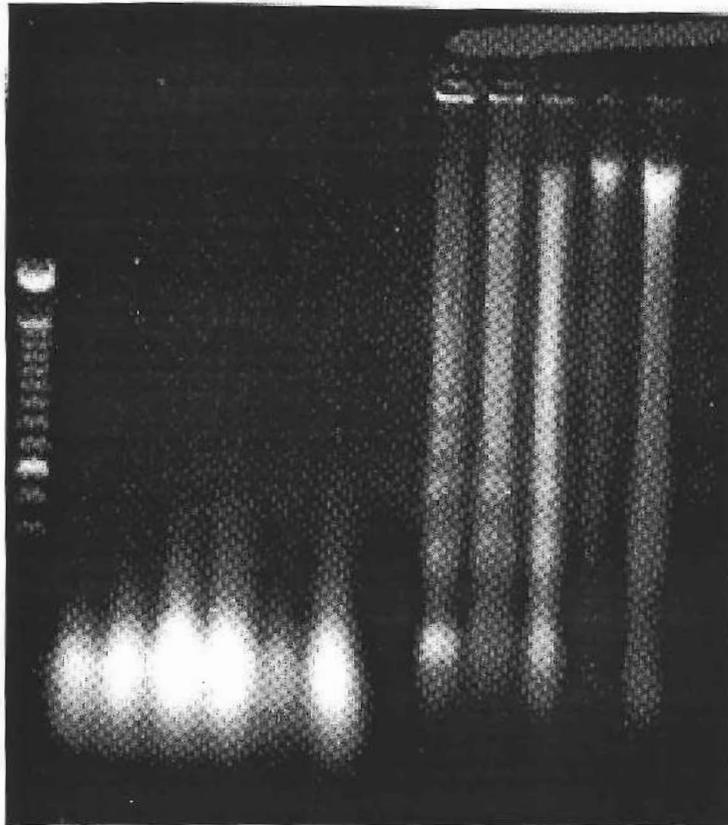
con carne de bovino. Las mezclas las realizan en carne cruda, tratada a 80°C, 100°C, 121°C durante 30, 20 y 10 minutos respectivamente. A pesar de que el autoclavado de la carne produce una digestión del ADN genómico, produciendo fragmentos de ADN genómico de 300 pares de bases (**Figura 3**), se obtienen amplificaciones positivas en carnes de porcino tratadas térmicamente a 121°C durante 10 minutos. Estos autores aplican este método a productos cárnicos comerciales. Por último, comparan los resultados obtenidos mediante la utilización de la técnica PCR, hibridación, ELISA y el test de Ouchterlony, concluyendo que los métodos basados en el ADN son más sensibles (2%), y pueden ser aplicados tanto carne tratada térmicamente como cruda (**Figura 4**).

En el caso de la especie ovina, Chikuni *et al.* (1994) amplificaron una región satélite específica de ovino y caprino, no observándose amplificación en búfalo, bovino, ciervo, porcino, equino, conejo y pollo. Posteriormente, tras la digestión con la enzima de restricción Apal es posible diferenciar la especie ovina de

caprino. Este fragmento permite la detección de carne tratada térmicamente en el caso de la especie ovina (120°C durante 30 minutos), no pudiéndose detectar la especie caprina.

Otro de los métodos utilizados para este tipo de identificación es el RAPD-PCR, de forma que el resultado corresponde con distinto patrón de bandas en cada una de las especies. La técnica RAPD-PCR consiste en la amplificación de ADN genómico utilizando como cebadores oligonucleótidos cortos de secuencia aleatoria en condiciones de baja astringencia (temperatura de hibridación entre 42-50°C) para producir patrones más o menos complejos de fragmentos de ADN.

**Figura 3.** En la figura se puede observar el efecto de las altas temperaturas sobre el ADN. Carrera1: marcador de talla, carreras 2-7: ADN extraído de carne autoclavada, carreras 8-12: ADN extraído de carne sin tratar térmicamente. En la fotografía se puede observar que al aumentar la temperatura el ADN se degrada en pequeños fragmentos (carreras 2-7).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Figura 4. Resultados de sensibilidad y capacidades de detección en carne tratada de distintos métodos estudiados (obtenido de Meyer et al., 1994).

**Table 1. Comparison of immunological (Ouchterlony and ELISA) and biomolecular (DNA hybridization and PCR) methods for species differentiation in raw and heat-treated mixtures of pork and beef<sup>a</sup>.**

Pork in beef, %	Treatment temperature, °C, and time, min	Ouchterlony <sup>b</sup>	ELISA <sup>c</sup>	DNA hybridization <sup>d</sup>	PCR
100	Raw	+	NT	+	+
50	Raw	+	NT	+	+
20	Raw	+	NT	+	+
10	Raw	+	NT	+	+
5	Raw	-	NT	+	+
2	Raw	-	NT	+	+
0	Raw	-	NT	-	-
100	80, 30	NA	NT	+	+
50	80, 30	NA	NT	+	+
20	80, 30	NA	NT	+	+
10	80, 30	NA	NT	+	+
5	80, 30	NA	NT	+	+
2	80, 30	NA	NT	+	+
0	80, 30	NA	NT	-	-
100	100, 20	NA	+	+	+
50	100, 20	NA	+	+	+
20	100, 20	NA	-	+	+
10	100, 20	NA	-	+	+
5	100, 20	NA	-	+	+
2	100, 20	NA	-	+	+
0	100, 20	NA	-	-	-
100	121, 10	NA	+	+	+
50	121, 10	NA	+	+	+
20	121, 10	NA	-	+	+
10	121, 10	NA	-	+	+
5	121, 10	NA	-	+	+
2	121, 10	NA	-	+	+
0	121, 10	NA	-	-	-
100	121, 20	NA	+	NT	+
100	121, 30	NA	+	NT	+
100	121, 45	NA	+	NT	+
100	121, 60	NA	+	NT	+

<sup>a</sup> NA, not applicable; NT, not tested.  
<sup>b</sup> Food Ouchterlony kit (The Binding Site).  
<sup>c</sup> Cooked Meat Species Identification Kit (Corteva Diagnostics).  
<sup>d</sup> Results taken from reference 8.  
<sup>e</sup> Results shown in Figure 3.

El empleo de los RAPDs se ha revelado adecuado para la identificación de especies y subespecies vegetales y animales. Son útiles en la detección de genes singulares y resultan idóneos como marcadores de diagnóstico en la identificación de estirpes y variedades (Rafalski y

Tingey, 1993). Análogamente a los RFLPs, micro y minisatélites los marcadores RAPD pueden ser polimórficos entre individuos, heredándose como caracteres mendelianos simples aunque se comportan generalmente como dominantes. Como ventajas podemos nombrar la baja cantidad de ADN necesaria, no requieren uso de radioactividad o información previa de secuencias y su bajo coste. Koh *et al.* (1998), observaron en carne roja que es posible la diferenciación de especies mediante RAPD-PCR, si bien los resultados resultan siempre un poco ambiguos, debido al problema de la presencia de polimorfismos dentro de la propia especie, que enmascararía los resultados. A pesar de esto, estos autores son capaces de diferenciar carne cruda de vaca, búfalo, canguro, caballo, cerdo, jabalí, gato, perro, ciervo y conejo, utilizando 200 ng de ADN genómico extraído de estas carnes y 35 ciclos de PCR.

Otro estudio interesante, es el llevado a cabo por Meer y Eddinger (1996), mediante la amplificación de una región específica del cromosoma Y porcino, que permite la detección sólo de machos. Estos autores aplican la técnica a productos crudos, salchichas, carnes con especias y carnes cocinadas a 50, 70 y 100°C durante 10 minutos. Mediante diluciones de ADN son capaces de detectar hasta 2 pg de ADN porcino, lo que supone una dilución de 1:10000 del ADN inicial. Este fragmento permite la detección de carne de machos, que presenta interés comercial, ya que son carnes más baratas por la producción del típico olor sexual.

También, se han utilizado regiones de ADN mitocondrial destacando el estudio de la región D-loop (Murray *et al.*, 1995), así como del citocromo b (cytb) (Meyer *et al.*, 1995, Matsunaga *et al.*, 1999). En ambos casos el precio del análisis se ve incrementado debido a la utilización de las enzimas de restricción. Meyer *et al.* (1995), consiguieron diferenciar cerdo, vaca, jabalí, búfalo, oveja, cabra, caballo, pollo y pavo. El método fue aplicado en carne cruda, tratada térmicamente (80°C durante 30 minutos), salchichas, salami y pastel de pollo. Con este método son

capaces de detectar hasta un 1% de carne de porcino en vacuno. Además, mediante este método consiguen diferenciar carne de animales de caza como el ciervo o el corzo. Matsunaga *et al.* (1999), sintetizaron pares de cebadores específicos para bovino, porcino, pollo, ovino, caprino y equino obteniendo fragmentos de ADN de distinto tamaño, incluso en carne cocinada a 100 y 120°C durante 30 minutos. No obstante, en equinos no se amplifica la muestra tratada a 120°C y en bovino aunque se observa, la amplificación es mucho más débil. La sensibilidad de la técnica es de 0.25 ng.

El cytb también ha sido aplicado para identificar especies de peces. Unseld *et al.* (1995), detectaron 9 especies distintas de atún, en productos enlatados y ahumados. Otro trabajo relacionado con el ADN mitocondrial es el descrito por Montiel-Sosa *et al.* (en prensa).

Los estudios de Murray *et al.* (1995), no están basados en los alimentos sino en muestras sanguíneas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el campo de la medicina forense se pueden extrapolar a los resultados esperados de muestras de carne o productos cárnicos una vez extraído su ADN. Así, dentro de la medicina forense encontramos bibliografía interesante como es el caso de Tartaglia *et al.* (1998), los cuales son capaces de detectar mediante la amplificación de ADN mitocondrial hasta 0.125% de derivados cárnicos y harinas de huesos de bovino en alimentos para el ganado. Otros trabajos a destacar son los de Lee y Chang (1994), Soteriou *et al.* (1995), Zehner *et al.* (1998). Lee y Chang (1994) fueron capaces de distinguir vacas, cabras, cerdos, perro, rata, conejo, pollo, pato y humana mediante la técnica RAPD-PCR. También, existen estudios para diferenciar especies de Galliformes (Hanotte *et al.* 1992). Estos estudios utilizan muestras sanguíneas, y estudian la huella genética obtenida al hibridar secuencias de ADN satélite con ADN digerido con enzimas de restricción, de las especies a diferenciar. Así, se han podido diferenciar codorniz, de pavo, faisán y pollo. Igualmente, esta

técnica se ha utilizado para diferenciar líneas de gallinas entre sí (Dunnington *et al.*, 1993).

Si hablamos de sensibilidad de la técnica, en el caso de mezclas de carne de distintas especies los que obtienen mejores resultados, en carne no cocinada son Wintero y Thomsem en 1990, que llegan a detectar un 0.5% de carne cruda de cerdo en vaca, mientras que Ebbehoj y Thomsen (1991a) detectan hasta un 0.01% de carne cruda de bovino en carne de oveja y cabra. Los mismos autores cuantifican carne de cerdo en carne de vaca cruda y tratada, así como en productos enlatados, detectando hasta un 0.1% en carne cruda y un 0.5% en carne tratada térmicamente (80 y 100°C durante 10 minutos, y 120°C durante 10, 20 y 30 minutos). La exactitud en la determinación de la cantidad de carne de cerdo es de un 10%, mientras que para pequeñas cantidades es entre el 20-100%. Por lo tanto, al disminuir la muestra se produce una pérdida de exactitud en la cuantificación. El uso de esta técnica resulta engorrosa y cara para su realización como rutina en el laboratorio.

Con relación a la técnica de PCR, Chinuki *et al.* (1994), mezclando experimentalmente ADN de ovino y bovino, tienen resultados positivos con 10 pg de ADN de ovino en una mezcla inicial de 375 ng realizando 35 ciclos de amplificación. Si hablamos de la sensibilidad de los métodos con respecto a la dilución de ADN de una especie en otra, los mejores resultados son los obtenidos por Meer y Eddenger (1996) mediante la amplificación de una región específica del cromosoma Y porcino, que sólo permite la detección de machos hasta 2pg de ADN porcino, mediante un PCR de 35 ciclos. Esta dilución 1:10000, que sería equivalente a detectar en una mezcla 0.001%. Meyer *et al.* (1994) amplificaron un fragmento de la hormona de crecimiento siendo capaces de detectar hasta un 2% de carne de cerdo en vaca, utilizando 300 mg de carne tratada o sin tratar térmicamente. Cuando se utiliza el ADN extraído con 30 ciclos de amplificación se detecta hasta un 5-10% de cerdo, con 35 ciclos un 1-5%

y realizando más de 35 ciclos hasta una cantidad mínima inferior al 1%. Además, son capaces de semicuantificar la contaminación de ADN de cerdo. Estos mismos autores, en 1995, proponen un método basado en la amplificación del *cytb* de DNA mitocondrial y posterior digestión con enzimas de restricción para su estudio. En este caso es posible detectar un 1 % de carne porcina tratada térmicamente (80°C durante 30 minutos) en carne bovina. Mediante la realización de un PCR dúplex con cebadores específicos para la hormona de crecimiento de bovino y porcino encuentran el límite de detección de una especie en otra en el 5%. Matsunaga *et al.* (1999) detectaron hasta 0.25 ng de ADN de bovino, porcino, caprino, pollo, ovino y equino en mezclas de ADN con otras especies. Por tanto, tras los resultados obtenidos hasta el momento, la cuantificación no parece un problema fácilmente abordable. A este respecto, Wintero y Thomsen (1990a) apuntaron la gran dificultad existente para la cuantificación mediante Slot-blot de una determinada especie a partir de una muestra. Hasta el momento son los métodos "tradicionales" los que se plantean como más interesantes para resolver este problema.

Debido al interés creciente de todos estos problemas, se están desarrollando nuevos métodos para cuantificar la introducción de carne de otra especie distinta a la declarada en el etiquetado. Un ejemplo, es la PCR cuantitativa a tiempo real, conocido como "TaqMan" (Holland *et al.*, 1991), basada en el uso de una sonda fluorescente que hibrida y detecta la secuencia de la especie buscada. Esta sonda que hibrida entre los cebadores específicos a la secuencia a amplificar, es desplazada y liberada en el proceso de elongación de la PCR, emitiendo fluorescencia, que puede ser medida y que corresponde con la cantidad de producto ADN inicial de la muestra. Mediante esta técnica se ha detectado y cuantificado productos genéticamente modificados, concretamente soja transgénica. (Vaitilingom *et al.*, 1999).

A modo de resumen, en el cuadro siguiente se exponen las ventajas e inconvenientes de los distintos métodos, haciendo especial hincapié en los basados en el análisis de ADN.

<b>Métodos</b>	<b>Ventajas/Inconvenientes</b>
<b>Métodos microscópicos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se puede detectar la integridad de las fibras musculares, y diferenciar la existencia de proteínas no cárnicas.</li> <li>2. No se puede identificar la especie.</li> </ol>
<b>Métodos basados en el análisis químico</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No se puede aplicar a mezclas y productos tratados térmicamente.</li> <li>2. Los resultados dependen de un gran número de factores.</li> <li>3. Los resultados presentan una gran variabilidad.</li> </ol>
<b>Métodos electroforéticos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Son aplicables a un gran número de especies en carne cruda. En algún caso presenta alta sensibilidad (1%).</li> <li>2. Se pueden cuantificar carne cruda en vaca, cerdo y pavo.</li> <li>3. Aplicable a carne tratada térmicamente, necesitando gran cantidad de manipulaciones.</li> </ol>
<b>Cromatografía líquida</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Método aplicable sólo a carne cruda.</li> <li>2. Permite la detección de algunas especies como cerdo, vaca y pavo.</li> <li>3. No permite la cuantificación.</li> </ol>

Métodos	Ventajas/Inconvenientes
<b>Métodos inmunológicos (Inmunodifusión)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estos métodos se han aplicado únicamente a carne cruda.</li> <li>2. Con este método no se puede cuantificar ya que no se detectan proteínas cárnicas sino plasmáticas.</li> <li>3. Se pueden diferenciar un gran número de especies, hasta un límite mínimo de un 1-3%. La diferenciación de ovino y caprino es difícil.</li> <li>4. Existen test comerciales que dan un diagnóstico muy rápido (ORBIT, PROFIT, PRIME, SOFT, MULTI-SIFT y "rapid dipstick test").</li> </ol>
<b>Métodos inmunológicos (ELISA)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se aplican a carne cruda y carne tratada térmicamente.</li> <li>2. Existen anticuerpos comerciales utilizables en la identificación de carne cruda.</li> <li>3. Presentan un límite de detección cercano al 1%.</li> <li>4. En pollo se ha podido cuantificar, en carne cruda, al utilizar anticuerpos "anti" proteínas musculares, y no "anti" proteínas séricas.</li> <li>5. Pueden realizarse gran número de muestras.</li> <li>6. En carne tratada térmicamente, la obtención de antígenos es muy laboriosa.</li> <li>7. No existen inmunoseros comercializados debido a su elevado coste económico.</li> <li>8. No es posible la cuantificación.</li> <li>9. Se puede detectar cerdo en productos autoclavados.</li> </ol>

Métodos	Ventajas/Inconvenientes
<p><b>Métodos basados en el análisis del ADN</b></p> <p><b>(Dot blot)</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alta sensibilidad, detectando hasta 0.01% en carne cruda y 0.5% de carne tratada térmicamente a 120°C durante 30 minutos.</li> <li>2. Aplicable a la mayoría de las especies.</li> <li>3. No permite la cuantificación.</li> <li>4. Pueden aparecer reacciones cruzadas entre especies filogenéticamente cercanas (ovino y caprino).</li> </ol>
<p><b>Métodos basados en el análisis del ADN</b></p> <p><b>(PCR)</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Técnica de fácil aplicación.</li> <li>2. Utilizable en carne tratada térmicamente y cruda.</li> <li>3. Alta sensibilidad del método.</li> <li>5. Aplicable en la mayoría de las especies.</li> <li>6. No se ha podido cuantificar.</li> </ol>

### 2.1.1.2. Detección de proteínas no cárnicas en productos cárnicos.

Además, de los fraudes de sustitución de especie, existen otros que consisten en la introducción de una proteína no cárnica en los productos supuestamente cárnicos. En el presente apartado vamos a tratar la introducción de soja, y de otras proteínas de uso más o menos frecuente. Como en el apartado anterior, haremos referencia a los métodos de detección microscópicos, electroforéticos, inmunológicos, para terminar describiendo los basados en el análisis del ADN.

#### 2.1.1.2.1. Detección de proteína de soja.

El fraude más característico de este tipo es la introducción de soja en los alimentos. Para su detección se ha utilizado la microscopía (Flint y Meech, 1978), y también métodos electroforéticos en productos tratados térmicamente (Janssen *et al.*, 1986).

Los primeros ensayos, se realizaron en los años 40, y estaban basados en inmuno-precipitación, detectando harina de soja en salchichas (Glyn, 1939, Ferguson, 1942). Además, Ferguson fue capaz de semicuantificar la cantidad de contaminación existente en el producto.

Hichcock *et al.* (1981), detectaron soja mediante la técnica ELISA, utilizando suero obtenido mediante inmunización con proteínas de soja desnaturalizadas y posteriormente renaturalizadas. Más adelante, Griffiths *et al.* (1984) y Crimes *et al.* (1984), utilizaron inmunosueros comerciales obtenidos mediante inmunización con proteínas desnaturalizadas por calor. Mediante este método consiguieron detectar mezclas de soja en carne entre un 0-7%. Si embargo, la repetibilidad de los resultados variaron entre 30 y 60% para la harina de soja y concentrado de soja respectivamente. La reproducibilidad de los resultados en ambos casos fue de un 70 %.

Rittenburg *et al.* (1987) y Hall *et al.* (1987), realizaron un ELISA indirecto, basado en el trabajo de Hitchcock *et al.* (1981), en el que mediante una renaturalización de las proteínas extraídas que actuarán como antígenos, mejoran la técnica, permitiendo la estimación de los niveles de soja en carne cruda y pasteurizada.

Ravestein y Driedonks (1986), desnaturalizaron y solubilizaron la proteína de la soja, hirviendo la muestra en presencia de dodecilsulfato de sodio y mercaptoetanol, utilizando el sobrenadante tras centrifugación como antígenos. Mediante esta técnica el análisis cuantitativo es posible hasta una cantidad de 0.5% de soja en la mezcla, incluso en productos esterilizados (120°C durante 30 minutos).

Por último, nos gustaría destacar el uso de la PCR en la detección del gen de la lectina de la soja (Meyer *et al.*, 1996), que permite detectar hasta un 1% de proteína de soja en la carne.

#### 2.1.1.2.2. Detección de otras proteínas.

Además de la soja, existen otras proteínas no cárnicas que son introducidas en los productos cárnicos con el objetivo de aumentar el porcentaje de proteína en los alimentos a bajo coste.

Los métodos para la detección de los mismos son numerosos. Dentro de los métodos electroforéticos destaca la electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Dysseler *et al.*, 1986, Kim *et al.*, 1987, Janssen *et al.*, 1987). Dysseler *et al.* detectaron gluten de trigo en productos cocinados, mientras que Kim *et al.* proteínas de la leche y soja en productos cárnicos de pollo. Por su parte, Janssen *et al.* detectaron gluten de trigo, proteínas del suero, caseína, ovoalbumina y proteína de soja en productos cárnicos tratados térmicamente. Hay que destacar, el trabajo realizado por Erikson y Ymae (1992), que describieron un análisis cuantitativo para la detección de proteínas del huevo y caseína de la leche mediante inmunoelectroforesis en productos cárnicos. Sin embargo, como ya hemos comentado, los métodos electroforéticos presentan el problema de una manipulación difícil y resultados en algunos casos no reproducibles. Como ventaja de este método destaca que pueden ser aplicados a productos cocinados, dónde los inmunoensayos no son efectivos.

Con relación a los inmunoensayos destaca el ELISA sándwich basado en anticuerpos monoclonales a través de los cuales es posible semicuantificar gluten de trigo, centeno y cebada, hasta detectar un 2% de gluten (Skerrit y Hill, 1990). Por último, destacar el trabajo de Turin y Bonami (1994), que combinando SDS-PAGE, son capaces de separar la ovoalbúmina de la muestra, con la técnica ELISA. De esta forma mediante anticuerpos anti-ovoalbúmina detectaron y cuantificaron la presencia de proteínas de huevos de gallina.

Para finalizar, hay que destacar que a pesar de que no existen en la bibliografía aplicaciones prácticas mediante el análisis del ADN, esta podría ser una técnica de elección, para la detección de células vegetales. Además, podría ser aplicado a carne tratada térmicamente mediante un proceso de extracción de ADN adecuado de las células de la especie vegetal que pudiese contener el alimento. Sin embargo, la detección de proteínas animales no cárnicas mediante el ADN presentaría más dificultades, ya que podríamos afirmar que hay ADN de otras especies pero no que proteína entra a formar parte de forma exógena a la composición natural del producto cárnico. Además, en una carne de vaca en la cual se adicione proteínas de leche de vaca, por ejemplo, no podríamos detectarlo.

En el cuadro siguiente, se pueden observar las ventajas e inconvenientes de los métodos revisados para la detección de soja y de otras proteínas.

	Métodos	Ventajas/Inconvenientes
SOJA	Microscopía	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Facilidad de la detección ya que con azul de toluidina se tiñen de otro color aunque presenta difícil detección en productos muy triturados y en los que la proteína esté muy desmenuzada.</li> <li>2. No se puede cuantificar</li> <li>3. Baja sensibilidad.</li> </ol>
	Electroforesis	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se detecta en productos tratados térmicamente.</li> </ol>

	Métodos	Ventajas/Inconvenientes
	<b>Inmunológicos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poca repetibilidad de resultados al aumentar la temperatura y tiempo.</li> <li>2. No existen sueros comerciales.</li> <li>3. Detección de hasta 0.5% de soja en productos tratados térmicamente.</li> </ol>
	<b>Basados en el análisis del ADN</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alta sensibilidad (1%)</li> <li>2. Se puede aplicar a productos tratados térmicamente.</li> </ol>
<b>OTRAS PROTEÍNAS</b>	<b>Electroforéticos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se pueden detectar en productos cocinados.</li> <li>2. Manipulación engorrosa.</li> <li>3. Resultados no reproducibles en algunos casos.</li> </ol>
	<b>Inmunológicos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alta sensibilidad.</li> <li>2. No aplicable a productos tratados térmicamente.</li> </ol>

### 2.1.1.3. Detección de carne recuperada mecánicamente (MRM).

Tradicionalmente el deshuesado de la carne se realiza manualmente, quedando carne residual en los huesos que pueden ser recuperadas mediante el uso de máquinas, denominándose el producto obtenido carne recuperada mecánicamente (MRM). Este tipo de carne aparece generalmente en productos cárnicos. Su principal característica es que el músculo no mantiene su integridad, por lo que resulta una carne de menor valor económico. En el Reino Unido, carne recuperada mecánicamente no puede ser introducida en un producto en más de un 5% sin indicarlo en la etiqueta. Si ésto no se cumple es considerado como una adulteración.

Pickering *et al.* (1995a, 1995b) diferenciaron mediante microscopía óptica carnes extraídas mecánicamente de carnes extraídas manualmente. El estudio se basa en la presencia de cartilago hialino, que se encuentra íntimamente asociado al hueso, y que está presente solamente en carnes extraídas mecánicamente. Carne de vaca y pollo extraída mecánicamente fue detectada hasta un límite de 10% y 25% respectivamente, incluso en carne enlatada, siendo muy difícil diferenciar la especie porcina.

Meech y Kirk (1986) y Crosland *et al.* (1995) estudiaron la composición química de la carne recuperada mecánicamente y la recuperada manualmente, encontrando diferencias no significativas entre ellas. Savage *et al.* (1995), mediante SDS-PAGE, estudiaron distintas sustancias del hueso que pueden ser liberadas al extraer mecánicamente carne de los huesos mediante altas presiones, obteniendo mejores resultados. Además, distinguieron carne extraída mecánicamente de muestras de carne cruda de bovino, ovino y porcino, comparando los perfiles electroforéticos de la mioglobina y hemoglobina, encontrando más dificultades con la carne de ave. Finalmente, Pickering *et al.* (1995b), identificaron carne extraída mecánicamente mediante anticuerpos específicos de la médula ósea de pollo, siendo posible diferenciar pollo y pavo.

En la actualidad, la microscopía óptica proporciona el método de búsqueda más rápido y sencillo, para la detección de carne extraída mecánicamente. También es posible la detección mediante electroforesis e inmunoensayos, pero a pesar de que son técnicas más complicadas pueden proporcionar una herramienta para la cuantificación de este tipo de carne.

### **2.1.2. Autenticación de la leche y quesos.**

La problemática existente en la autenticación de la leche y quesos se centra en la identificación de las especies que componen la leche. El fraude más común es la sustitución de leche de cabra y oveja, por leche de vaca que tiene menor valor económico. Además, en los quesos el origen de especie de la leche que lo compone, debe de estar perfectamente detallado en el etiquetado.

Como en los casos anteriores, se han desarrollado un gran número de técnicas para resolver esta problemática.

Con relación a los métodos basados en el estudio de la composición química, los trabajos se han centrado en el estudio de la composición de la fracción grasa de la leche. Concretamente, Iverson y Sheppard (1989) encontraron la relación ácido laúrico/ácido cáprico útil para detectar la presencia de leche de vaca en leche de oveja o cabra en quesos, sin ser capaces de diferenciar mezclas de leche de oveja y cabra.

La composición de ácidos grasos parece ser un método más adecuado para detectar la presencia de grasa con un origen no lácteo. La relación ácido butírico/ácido oleico resulta útil para discriminar grasa vegetal (hasta un 10%) en mantequilla y queso (Fox *et al.*, 1988). Sin embargo, la sensibilidad del test está limitada por la variabilidad de la composición de los productos naturales. Villanueva *et al.* (1988), analizaron la composición de triglicéridos mediante cromatografía gaseosa, detectando un 10% de adulteración de grasa de origen no lácteo en el 100% de los casos, y un 5% en el 97% de los casos. Otros autores estudian la presencia de esteroides de aceites vegetales como buenos indicadores de adulteración (Younes y Soliman, 1987).



Otra técnica utilizada, para diferenciar grasa vegetal de animal, ha sido la cromatografía líquida de proteínas (HPLC) (Lopez-Fandino, 1993, y Urbanke *et al.*, 1992), también utilizada para la detección de leche de soja en leche de vaca, detectando hasta un 1-5% de leche de soja (Hewedy y Smith, 1989).

Respecto a las técnicas electroforéticas desarrolladas para identificar las distintas especies en la leche y sus derivados, Moio *et al.* (1990), detectaron mediante isoelectroenfoque leche de vaca en mezclas con leche de ovino, caprino y búfalo en leche y queso, hasta un límite mínimo de 0.5%. Este método es utilizado como referencia en la comunidad europea (EEC (1992) Commission regulation 690/92/EEC) para detectar caseínas de la leche de vaca en quesos de oveja. Molina *et al.* (1995), también determinaron la composición de especie en quesos, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e isoelectroenfoque de las proteínas del suero, y posterior medida de la intensidad óptica de las bandas obtenidas.

En cuanto a los métodos inmunológicos, mediante la técnica ELISA, Rodríguez *et al.* (1990), detectaron leche de vaca en leche de oveja y en quesos, cuantificando porcentajes entre el 1-50%. Aranda *et al.* (1993), describieron la técnica de inmunoblotting, a través de la cual se puede detectar en 2 horas hasta un 0.5% de leche de caprino o bovino en leche de ovino y quesos de esta especie. García *et al.* (1993), realizaron un sándwich ELISA detectando leche de cabra en oveja hasta un límite similar al anterior. Rolland *et al.* (1993, 1995), detectaron hasta un 0.125% de leche de vaca en ovino y 0.5% en el caso de los quesos. Hay que destacar también los trabajos de Levieux y Venien (1994), que mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra la  $\beta$ -lactoglobulina, detectaron una parte de leche de vaca en 100.000 partes de leche de cabra u oveja. Anguita *et al.* (1997), detectaron cuantitativamente entre un

rango de sustitución de 0.5 a 25% de leche de vaca en quesos de cabra y oveja, mediante la técnica ELISA y anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ -caseína bovina.

Amigo *et al.* (1992), compararon métodos electroforéticos en geles de poliácridamida, isoelectroenfoque e inmunodifusión, siendo este último, el método con el que se encuentran más errores en la detección de leche de vaca y cabra.

Como en el caso anterior, la tecnología del ADN no ha sido utilizada para la detección de leche de bovino, ovino y caprino en leche o queso. Los métodos y secuencias específicas utilizados para la detección de carne de estas especies podrían ser extrapolados al uso de los mismos en leche y quesos tras la extracción de ADN. Uno de los principales inconvenientes es la extracción del ADN del queso por la presencia de inhibidores *taq* DNA polimerasa (Rossen *et al.*, 1992), y el pequeño número de células que se encuentran en dichos alimentos. Este problema se ha solucionado, en la actualidad, con distintos métodos de extracción (Kling *et al.*, 1994, Lanz *et al.*, 1994).

Las ventajas e inconvenientes de las técnicas utilizadas hasta el momento se pueden ver en el siguiente cuadro:

Métodos	Ventajas/Inconvenientes
<b>Métodos basados en la composición química</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se pueden detectar grasas de origen no animal.</li> <li>2. Sólo se puede identificar vaca.</li> <li>3. Resultados variables.</li> </ol>
<b>Electroforéticos</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Isoelectroenfoque es la técnica de referencia de la UE.</li> <li>2. Sólo se detecta vaca.</li> <li>3. Método sensible (0.5%).</li> </ol>

Métodos	Ventajas/Inconvenientes
Inmunológicos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se puede detectar vaca y cabra.</li> <li>2. Muy sensibles (0.125 y 0.5% de leche y queso).</li> <li>3. Método muy rápido.</li> <li>4. Es posible la cuantificación.</li> </ol>

## 2.2. BÚSQUEDA DE REGIONES REPETIDAS EN EL GENOMA ESPECIE-ESPECÍFICAS.

La búsqueda de regiones repetidas en el genoma de las distintas especies presenta numerosas aplicaciones. Por un lado, como acabamos de ver en la autenticación de alimentos, los métodos basados en el análisis del ADN son más sensibles, y pueden ser aplicables a cualquier producto. Por estas razones resulta de gran interés la búsqueda de nuevos fragmentos del genoma que sean más sensibles y específicos de especie y aplicables a distintos productos alimenticios, como son los fragmentos de ADN altamente repetidos en el genoma.

Otra de las aplicaciones del aislamiento de secuencias repetidas, es su utilización en el desarrollo de los mapas genéticos. El desarrollo de los mapas genéticos de las distintas especies animales y humana están adquiriendo una gran importancia, existiendo diversos proyectos que engloban a distintos países para cada una de las especies que se estudian. En el caso concreto del ganado porcino existe el proyecto PigMap (Archibald *et al.*, 1995), que en estos momentos, se centra en la realización de mapas de alta resolución (distancias pequeñas entre marcadores) que permitan el conocimiento de zonas poco estudiadas del genoma y su posible relación con caracteres productivos y de interés económico. Es decir, el objetivo consiste en buscar marcadores polimórficos uniformemente repartidos por el genoma, a través de los

cuales se pueda llegar al aislamiento, secuenciación y localización de genes concretos relacionados con caracteres de interés económico o enfermedades (ETLs, Economic trait loci), así como marcadores relacionados con caracteres de tipo cuantitativo, más productivos (QTLS, quantitative trait loci). Asimismo, el conocimiento del mapa genético presenta otras aplicaciones como son estudios de evolución y biodiversidad e identificación de parentescos.

Los marcadores de elección utilizados a lo largo del desarrollo de los mapas hasta ahora han sido: los microsatélites, los LINEs (Long Interspersed Elements) y los SINEs (Short Interspersed Elements).

Los microsatélites o STR son secuencias del genoma altamente polimórficas repartidos por todo el genoma que consisten en repeticiones de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos [(A) $_n$ , (AC) $_n$ , (GAG) $_n$ , (CTGA) $_n$ ] (Moran, 1993).

Inicialmente, para la localización de estos marcadores se estudiaron las bases de datos, localizando estos microsatélites en secuencias intrónicas de genes descritos por otros autores para otro tipo de finalidad. Sin embargo, tras los estudios realizados por distintos grupos de investigación sobre dichos marcadores existe la necesidad de desarrollar otras tecnologías.

Uno de estos métodos sería la búsqueda al azar de estos marcadores en librerías de DNA genómico (digerido en pequeños fragmentos y clonados en plásmidos) mediante la hibridación de estos fragmentos con una sonda marcada (secuencia de ADN con las repeticiones específicas del microsatélite). Este método ha sido utilizado para el aislamiento de diversos microsatélites (Vaiman *et al.*, 1992, Refseth *et al.*, 1997). Son dos los inconvenientes de este tipo de método, en primer lugar es más laborioso que la utilización de la PCR, y en segundo lugar es fácil volver a localizar los microsatélites ya descritos por otros autores.

Por último, hay que destacar el método descrito por Weber y May (1989), basado en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y en la cartografía comparativa entre especies. En primer lugar se consigue la amplificación entre dos oligonucleótidos específicos que flaquean la región microsatélite de una determinada especie para posteriormente amplificarlos en otra. Sin embargo, debido a la localización de los microsatélites en regiones no codificantes, puede presentarse el problema de que la zona estudiada no esté conservada entre especies. A este respecto, tenemos que apuntar como ejemplo, que solamente existe un 21 % de conservación de secuencias microsatélites entre porcino y humano (Milan *et al.*, 1994).

Como ya hemos indicado, otros marcadores altamente polimórficos y repartidos por el genoma son los SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) y los LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements). La mayoría de las familias de ADN pertenecientes a esta clase, contienen miembros con capacidad de retrotransposición o transposición a partir de un ARN intermedio. Fue Singer (1982), quien clasificó en los mamíferos las familias de ADN repetitivo disperso, dependiendo de la longitud de su secuencia consenso en dos clases: SINEs y LINEs.

Por su parte, Weiner *et al.* (1986), definieron los SINEs como secuencias cortas (70-300 pb), pudiéndose encontrar más de 100.000 copias de elementos de una familia determinada. Uno de los ejemplos más conocidos de este tipo de secuencias es la familia humana conocida como Alu, si bien, estos elementos han sido descritos en un gran número de especies, como por ejemplo, en la especie porcina (Frengen *et al.* (1991) y Ellegren (1993)).

Economou *et al.* (1990), describieron una nueva clase de polimorfismos del ADN, relacionadas con los SINEs, basada en la variación de la longitud de las colas de adeninas en el extremo 3' (pudiendo ser

considerados como microsatélites), y que en general son denominados SINEVA (SINE variable poli A). Estos autores definieron además la potencialidad de otras secuencias que poseen cadenas de poli (A), como los LINEs, Pseudogenes o retroposones, para ser polimórficos. Ellegren (1993) y Gallagher *et al.* (1999) han asociado los SINE a microsatélites.

Estos polimorfismos, generalmente situados en intrones (asociados a genes), pueden ser de gran utilidad para la cartografía por ligamiento de genes ya descritos e incluso localizados físicamente, en los que es muy difícil realizar un análisis de ligamiento debido a la falta o escasez de variación en la secuencia codificante.

Por otra parte, Hwu *et al.* (1986), afirmaron que los genomas de los mamíferos contienen unas 50.000 copias de LINEs conocido como familia L1, de longitud superior a 6Kb y variables (Weiner *et al.*, 1986). Las familias de LINEs son más escasas que las de los SINEs. Además, dentro de las grandes familias se han identificado subfamilias originadas por los procesos de evolución (Hayward *et al.*, 1997). Los elementos de esta familia, en las distintas especies, presentan una elevada homología. Como ocurría con las repeticiones Alu, los elementos L1 no se localizan en secuencias codificantes.

Para el aislamiento de SINEs y LINEs se realizan procedimientos similares a los anteriormente descritos para los microsatélites. Un método consiste en la búsqueda al azar de estos marcadores en librerías de DNA genómico digerido en pequeños fragmentos y clonados en plásmidos, mediante la hibridación de estos fragmentos con una sonda marcada (secuencia de ADN de SINEs y LINEs). De nuevo esta tecnología presenta el inconveniente de ser más laboriosa que la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Como hemos descrito en el caso de los microsatélites, otro método consiste en la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y la cartografía comparativa entre

especies, amplificando la zona mediante dos oligonucleótidos específicos que flaquean la secuencia LINE o SINE. Sin embargo, al igual que en el caso de los microsatélites, estas secuencias se localizan en regiones no codificantes, y puede existir el problema de que la zona estudiada no esté conservada.

Otras metodologías más específicas están relacionadas con las secuencias de nucleótidos que se conservan entre los distintos SINEs y LINEs. El método consiste en diseñar cebadores en estas zonas conservadas y realizar una PCR con los mismos. Esta técnica se denomina IRS-PCR (Interspersed Repeat Sequences-Polimerase Chain Reaction) ha sido descrita tanto en SINEs o Alu-PCR (Nelson *et al.*, 1989, Ledbetter *et al.*, 1990) y también en LINEs o L1 PCR (Miller, 1994). Sin embargo, esta técnica no permite el aislamiento de secuencias repetidas sino el de las secuencias contenidas entre ellas. Tang *et al.* (1995), realizaron un PCR múltiple utilizando SINE-primers (oligonucleótidos complementarios a las secuencias SINEs) y otro cebador diseñado según la secuencia flanqueante a algún SINE en el extremo 3'. Diferentes parejas de SINE- primers, consistentes en un cebador marcado específico del locus y otro complementario a la región SINE, producen variedad de bandas como resultado de una amplificación múltiple. Parece ser que los cebadores de moderada longitud a menudo pueden unirse a regiones distintas de su locus específico, sin embargo sólo si utilizamos un cebador multiespecífico (SINE-primer) podemos visualizar esa variedad de bandas. Además, como la zona del extremo 3' de los SINEs es muy polimórfica, estos autores consiguieron amplificar en una única reacción 2 o 3 polimorfismos a la vez, únicamente relacionados con SINEs.

Otro tipo de secuencias altamente repetidas en el genoma son los MIRs (mammalian-wide interspersed repeats), que parecen integrarse en el genoma en el periodo anterior a la radiación de los mamíferos (Smit y Riggs, 1995). Los MIRs son SINEs clásicos que derivan de tARN con una

secuencia de 65 pares de bases homóloga a la zona central de un grupo de SINE (Gilbert y Labuda, 1999). En este grupo el extremo 3' presenta una secuencia compartida con elementos LINE. El número de elementos MIR en el genoma humano se estima alrededor de  $3.3 \times 10^5$  (Matassi *et al.*, 1998).

El aislamiento de estos elementos repetidos puede realizarse mediante la síntesis de un cebador en sus zonas conservadas, y aplicación posterior de la PCR (Iantsen *et al.*, 1997). Otro tipo de secuencias altamente repetidas en el genoma son las secuencias MER (medium reiteration frequency sequences), que a pesar de que el número de copias es mucho menor que los LINE, pueden tener aplicación en el desarrollo de los mapas como señales intermedias (Kawashima *et al.*, 1992).

Como hemos comentado al inicio de este apartado, la utilización de métodos que permitan la detección y análisis de estas secuencias puede resultar muy útil, tanto para completar los distintos mapas genéticos de las distintas especies, como para las aplicaciones que de los mismos se puedan generar.

### **2.3. CANTIDAD Y CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS DE ORIGEN PORCINO.**

En la actualidad el desarrollo del subsector porcino es manifiesto. En 1995 la producción mundial de carne se situaba alrededor de 190 millones de toneladas, de las cuales el 41.5% pertenecían a carne porcina. El subsector porcino español, que viene a aportar el 30% de la producción final ganadera en España, presenta una serie de particularidades (Forcada, 1997):

- Gran incremento del censo en los últimos 25 años (prácticamente se ha triplicado).

- Está representado en su mayoría por la explotación intensiva (el 90%).
- Infraestructura deficiente debido al pequeño tamaño de las explotaciones.
- Elevada regionalización tanto del censo como de la producción. Lo que provoca una corriente de lechones con destino a cebo y una corriente de cerdos cebados con destino a mataderos. Estas largas distancias de transporte producen estrés en los animales que supone un deterioro en la calidad de la carne (Buxade, 1995).
- Gran consumo de productos porcinos en nuestro país. El 50% del consumo de carne en España es carne porcina.
- Otro punto que no podemos olvidar es el bienestar animal. El no cumplimiento de las normas mínimas exigidas por la Unión Europea (Directiva 91/630) con relación al bienestar animal, produce un mayor estrés en los animales en el momento del sacrificio y la aparición de carnes DFD y PSE en animales genéticamente susceptibles (Oliver, 1997).
- Por último no hay que olvidar que la aparición de razas altamente especializadas y la poca rentabilidad de razas autóctonas, hace que estas disminuyan en número. Esto supone un riesgo, ya que las razas autóctonas pueden adaptarse a condiciones adversas en determinadas formas de producción, y dar lugar a productos típicos autóctonos. De ahí la importancia de caracterizar estas razas genéticamente mediante estudios de biodiversidad.
- La firma de los acuerdos de la Ronda de Uruguay del GATT, supuso una limitación de la producción de carne porcino y de derivados de la misma a los países miembros de la Unión Europea. En definitiva el futuro del subsector porcino, sólo será apto, para los más eficaces lo que

producirá una intensificación del sector (Buxade, 1995). Esta intensificación del sector porcino nos lleva a la especialización de las líneas porcinas, para buscar productos de mayor calidad. Esta calidad del producto estará relacionada con la aceptabilidad de este producto por parte del consumidor. La calidad percibida por el consumidor sobre un producto se basa en las características físicas de ese producto, en la información que tienen del mismo o en la combinación de ambas cosas (Cardello, 1995). Es decir, para unos consumidores una carne de alta calidad puede ser aquella que presente bajos contenidos de grasa, sin embargo otro consumidor puede preferir carne con mayor cantidad de grasa por su mayor bouquet.

Los puntos anteriormente mencionados hacen necesaria la búsqueda de estrategias para minimizar los problemas derivados del estrés, y encontrar estrategias de trabajo que puedan favorecer la selección a favor de caracteres productivos y de calidad de carne. Estas estrategias pueden conseguirse con la localización a nivel de ADN de loci relacionados con características cuantitativas (QTLs) o económicas (ETLs). El uso de marcadores como ayuda en los programas de producción, es decir la selección asistida por marcadores (MAS), se presenta en un futuro como la mejor estrategia en los programas de cría porcina (Soller, 1990; Kennedy *et al*, 1990). Sin embargo, estos programas de selección asistida por marcadores sólo pueden ser utilizados en las razas o cruces en los que se ha estudiado la influencia de ese QTL/ETL (Spelman y Bovenhuis, 1998) ya que puede observarse un efecto del QTL en un determinado cruce pero en otra raza no lo tiene o presenta mayor varianza.

A continuación, vamos a hacer un resumen de los principales QTLs y ETLs que se han descrito en la especie porcina.

### **2.3.1. QTL/ETL en la especie porcina**

El desarrollo del mapa genético porcino es una herramienta rápida para analizar y localizar loci relacionados con características cuantitativas de interés económico, denominados QTLs/ETLs. La cartografía de QTLs/ETLs persigue actualmente dos objetivos fundamentales: por una parte incrementar el conocimiento de la variación cuantitativa y por otra identificar genes de alto valor económico y aplicar los resultados a los programas de cría porcina, para posteriormente fijar, en determinadas líneas, el alelo con ventajas productivas mediante selección. Localizar los QTLs en el mapa genético no es una tarea fácil, debido a que la contribución de cada uno de estos loci a la totalidad de un fenotipo puede ser pequeña. Por tanto, es muy importante disponer de unos mapas con un número suficiente de marcadores polimórficos (son los denominados mapas de alta resolución), así como estudiar un gran número de animales.

Son numerosos los ETLs/QTLs descritos hasta el momento en la especie porcina, localizados por métodos basados en el análisis del desequilibrio de ligamiento entre loci marcadores y el supuesto QTL/ETL. Por tanto, para ser capaces de observar las diferencias entre genotipos es necesario la existencia de un desequilibrio inicial entre el locus y el QTL. La forma más común de producir este desequilibrio de ligamiento es mediante el cruce entre razas. Cuanto mayor sea la diferencia genética entre las razas mayor es el desequilibrio genético y por tanto las diferencias en las frecuencias génicas de los diferentes alelos. El cruce más comúnmente utilizado en porcino es Large White x Meshian. En este

cruce la raza Meshian es una raza rústica y poco evolucionada frente a Large White que está seleccionada a favor de la calidad de carne.

La mayoría de los estudios llevados a cabo en la especie porcina se realizan mediante "interval mapping" o barrido con marcadores, es decir, se estudian regiones del genoma que estadísticamente (generalmente análisis de regresión) puedan estar asociadas a QTLs. En primer lugar, se detectan regiones cromosómicas en las que puede existir un QTL/ETL, para posteriormente analizar los genotipos de un gran número de marcadores polimórficos extendidos por todos los cromosomas en familias de animales (generalmente una F2) en los que se tienen cuantificados los distintos caracteres productivos, reproductivos o de calidad de carne.

Otros métodos para detectar QTLs/ETL consisten en estudiar la posible asociación entre alelos del gen candidato propuesto con los caracteres productivos de las familias.

La tabla siguiente muestra algunos QTL/ETL aislados hasta el momento, su localización genética y el gen asociado en el caso de conocerse :

INFLUENCIA	GEN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Grasa intramuscular		SSC2,SSC4,SSC6,SSC7	Koning <i>et al.</i> , 1999.
Grosor de la grasa dorsal		SSC1,SSC2,SSC6, SSC7	
Capacidad uterina		SSC8	Rohrer <i>et al.</i> , 1999.
Nºóvulos /estro		SSC1,SSC10	

INFLUENCIA	GEN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Lechones vivos/parto Duración gestación Tamaño de camada		SSC6 SSC9,SSC15 SSC15	Wilkie <i>et al.</i> , 1999
QTLs relacionados con engrasamiento y crecimiento		SSC4	Marklund <i>et al.</i> , 1999
Ganancia media diaria		SSC1 SSC4	Paszek <i>et al.</i> , 1999 Wang <i>et al.</i> , 1998
Espesor grasa dorsal		SSC7	Wang <i>et al.</i> , 1998
QTLs que afectan a la composición de la canal		SSC1,SSC7,SSCX	Rohrer y Keele, 1998b.
QTLs que afectan a la deposición de grasa		SSC1,SSC7,SSCX SSC5,8,9,10, 14	Rohrer y Keele, 1998a.
Grasa dorsal y grasa abdominal Longitud del intestino. Ganancia de peso diario medio hasta 30 Kg		SSC4 SSC3,4,5 SCC13	Knott <i>et al.</i> , 1998

INFLUENCIA	GEN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Ganancia de peso diario medio de 30 a 70 kg		SCC10	Knott <i>et al.</i> , 1998
QTLs relacionados con el tamaño de la canal y la calidad de la carne		SSC2,3,48	Andersson-Eklund <i>et al.</i> , 1998
Óvulos/ovulación		SSC4,13,15	Rathje <i>et al.</i> , 1997
Ganancia media diaria	IGF-1		Casas-Carrillo <i>et al.</i> , 1997.
Peso al destete	Haptoglobina (HP)		Clamp <i>et al.</i> , 1992
Ganancia de peso diario	Glucosa fosfato isomerasa (GPI)		
Rendimiento Napole de la carne	RN	SSC15	Milan <i>et al.</i> , 1996
Grasa intramuscular	Proteínas de unión a los ácidos grasos (FABP)	SCC8	Pas y Gerbens, 1998.
Grasa abdominal		SCC12	Kuryl, 1998
Peso del jamón		SCC4	
Crecimiento diario		SSC2, 8	Kuryl, 1998

INFLUENCIA	GEN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Número de lechones/parto	Receptor del estrógeno (ESR)	SSC1	Rothschild <i>et al.</i> , 1994
Resistencia a <i>Escherichia coli</i>	K88	SCC13	Sellwood, 1979.
Peso y viabilidad de los lechones, tamaño de la camada	Complejo mayor de histocompatibilidad porcino (SLA)	SSC7	Jung <i>et al.</i> , 1989.
Resistencia a enfermedades #	TGFA TGFB-2 TGFB-3, interleuquina 8(IL-8) chemoquina MCP-2	SSC3q SSC10p SSC7q SSC8 SSC12q	Hu <i>et al.</i> , 1996
Engrasamiento	Hormona de crecimiento (GH)	SSC12	Knorr <i>et al.</i> , 1997
	# Enzima málica (ME1)	SSC1	Nunes <i>et al.</i> , 1996
	# Gen de la leptina (OBS)	SSC18	Neuenschwander <i>et al.</i> , 1996
Crecimiento y engrasamiento		SSC4	Andersson <i>et al.</i> , 1994
Mortalidad por estrés y cantidad de magro	Receptor de la ryanodina (RYR-1)	SSC6	Grobet <i>et al.</i> , 1992

#No ha sido testada la asociación de los distintos genotipos con los caracteres productivos. Se supone una asociación por función.

Como puede observarse en la tabla anexa se han detectado numerosas regiones cromosómicas asociadas a efectos QTL/ETL. El conocimiento de estos genes, puede favorecer la selección animal (MAS, selección asistida por marcadores) mediante la elección de un determinado alelo del gen que favorezca algún carácter de calidad (cantidad de magro, cantidad de grasa extra e intracelular). Por estos motivos nos pareció importante el estudio de genes candidatos no estudiados hasta el momento en porcino, como son la ACACA (acetil-CoA carboxilasa A), MGAM (maltasa-glucoamilasa) y ppk98, que como a continuación vamos a ver tiene funciones fisiológicas muy importantes.

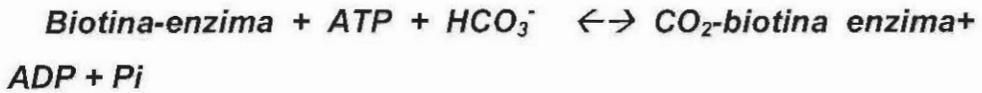
### **2.3.1.1. Acetil-CoA carboxilasa (ACACA).**

#### *2.3.1.1.1. Bioquímica de la ACACA.*

La acetil-Co A carboxilasa, es una enzima que interviene en la síntesis de ácidos grasos.

La síntesis de ácidos grasos comienza con la carboxilación del acetil CoA hasta malonil CoA, reacción irreversible y que representa la etapa limitante de la formación de éstos. Esta reacción está catalizada por la ACETIL-COA CARBOXILASA, que posee como grupo prostético la biotina (el grupo carboxilo de la biotina se encuentra unido al grupo amino de un residuo de la lisina) (Stryer, 1996). La carboxilación del acetil CoA tiene lugar en dos etapas:

1. Formación de un intermediario de la carboxibiotina a expensas de un ATP y en presencia de bicarbonato.



2. El grupo  $\text{CO}_2$  activado de este intermediario se transfiere entonces al acetil CoA para formar malonil CoA.



Los substratos se unen a la acetil-CoA carboxilasa y los productos se van liberando siguiendo una secuencia específica. Esta enzima es un ejemplo típico de mecanismo de reacción "ping-pong" en que se liberan uno o más productos antes de que todos los substratos se hayan enlazado.

En procariontes la acetil-CoA carboxilasa está desdoblada en subunidades que catalizan reacciones parciales. La biotina está unida covalentemente a una proteína pequeña (22KD) llamada proteína portadora de la carboxi biotina. La carboxilación de la biotina en esta proteína portadora está catalizada por una subunidad denominada biotina carboxilasa. El tercer componente del sistema es una transcarboxilasa que cataliza la transferencia del  $\text{CO}_2$  desde la carboxibiotina hasta el acetil-CoA (Stryer, 1996).

La regulación de la acetil-CoA carboxilasa es muy compleja, e intervienen gran cantidad de factores. Como ya hemos indicado, la acetil-

CoA carboxilasa es el paso limitante de la síntesis de ácidos grasos, actuando cuando hay una gran cantidad de carbohidratos, y la carga energética es elevada, ya que en ese momento hay una necesidad de síntesis de ácidos grasos.

El mecanismo de activación y desactivación de esta enzima es mediante fosforilación y defosforilación. Una proteína quinasa activada por AMP transforma la carboxilasa en forma inactiva. A su vez la quinasa es estimulada por el AMP e inhibida por el ATP. El grupo fosforilo de la carboxilasa inactiva es eliminado por una fosfatasa. Por lo tanto, la proporción de carboxilasa en su forma activa depende de las velocidades catalíticas de estas enzimas antagónicas.

La carboxilasa está controlada por tres señales distintas: el glucagón, la adrenalina y la insulina, que reflejan las necesidades de todo el organismo. La insulina estimula la síntesis de ácidos grasos mediante la activación de la carboxilasa, en tanto que el glucagón y la adrenalina tienen el efecto opuesto. También ejercen un control los niveles de citrato estimulando la síntesis de ácidos grasos, el ADP y el ácido graso palmitil-Coa que produce la inhibición de la carboxilasa (Mabrouk *et al.*, 1990). La adrenalina y el glucagón activan la proteína quinasa A, que a su vez inhibe la fosfatasa fosforilándola. Por consiguiente estas hormonas catabólicas desconectan la síntesis de ácidos grasos porque mantienen a la fosforilasa en su estado de fosforilación inactivo. La forma inactiva también predomina cuando la carga energética de la célula es baja debido a que la fosforilación se ve estimulada por un nivel alto de AMP. La insulina por el contrario estimula la carboxilasa siendo uno de los posibles mecanismos la activación por parte de la insulina de la proteína fosfatasa, convirtiendo a la carboxilasa en su forma activa desfosforilada. El control hormonal de la acetil-CoA carboxilasa es similar al de la glucógeno sintasa (Kim y cols., 1999).

También, la acetil-CoA carboxilasa es estimulada alostéricamente por el citrato, ya que invierte la inhibición producida por la fosforilación. El nivel de citrato es elevado cuando abundan el acetil-CoA y el ATP, indicando que fragmentos de dos carbonos y el ATP están disponibles para la síntesis de ácidos grasos. El efecto estimulador del citrato sobre la carboxilasa es contrarrestado por el palmitil-CoA, que presenta niveles elevados cuando hay un exceso de ácidos grasos. El ácido graso activado palmitil-CoA también inhibe la translocasa que transfiere citrato de la mitocondria al citosol, así como la generación NADPH por la glucosa-6-P-deshidrogenasa.

La síntesis y degradación de ácidos grasos está regulada de forma recíproca de forma que no pueden ser simultáneamente activas. Durante el ayuno aumenta el nivel de ácidos grasos porque las hormonas adrenalina y glucagón estimulan a la lipasa de las células adiposas, produciendo el efecto contrario a la insulina.

La entrada de los acil-CoA de ácidos grasos a la matriz mitocondrial también está regulada. El ácido graso activado malonil-CoA que está presente a concentraciones elevadas cuando abundan las moléculas combustibles, inhibe a la carnitina acil transferasa I. Por consiguiente, en momentos de plenitud y de bienestar, los ácidos grasos no tiene fácil acceso a la matriz mitocondrial. Además dos enzimas de la  $\beta$ -oxidación, la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y la tiolasa, están claramente inhibidos cuando la carga energética es alta, por el NADH y el acetil-Coa respectivamente.

El control a largo plazo de la síntesis de ácidos grasos está vinculado a cambios en las velocidades de síntesis y degradación de las enzimas que participan en la misma. Los animales que han sufrido ayunos prolongados, experimentan al administrarles una dieta rica en azúcares y baja en grasa, un aumento de los niveles de acetil-CoA carboxilasa y de

ácido graso sintasa en el hígado. Este tipo de regulación se denomina control adaptativo (Stryer, 1996).

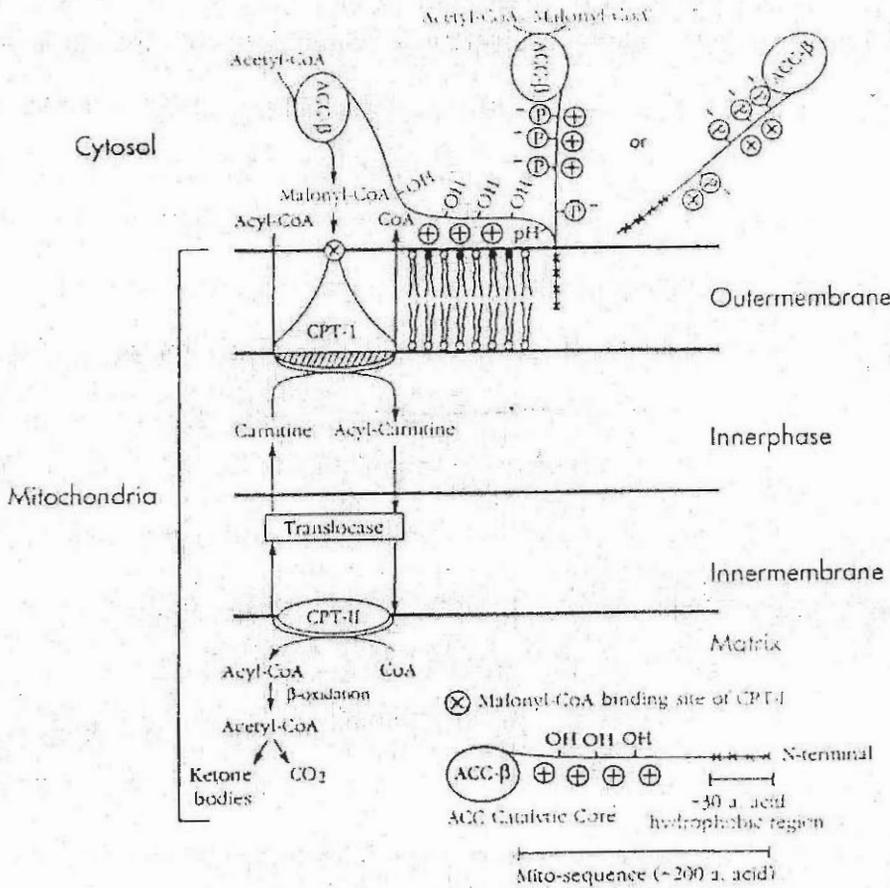
Durante el ejercicio físico se produce una disminución de la cantidad de manoil-CoA debido a una fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa. De esta manera la carnitil palmitoil transferasa, que es una enzima importante en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, se mantiene activa (el manoil-CoA es un inhibidor) (Winder, 1998).

Hay que destacar la existencia de otra isoforma de esta enzima que presenta funciones distintas. Esta isoforma es la acetil-CoA carboxilasa  $\beta$ , que es codificada por un gen distinto a la acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$ , que hasta ahora hemos descrito. Abu-Elheiga *et al.* (1995), pusieron en evidencia la existencia de esta otra enzima de la acetil-CoA carboxilasa, 114 aminoácidos más larga. La acetil-CoA carboxilasa  $\beta$  presenta importancia en la oxidación de los ácidos grasos, y estaría encargada de regular la actividad de la carnitil palmitoil-CoA transferasa I (CPT-1), en la oxidación de ácidos grasos. Esta enzima está localizada en la membrana mitocondrial, y genera palmitoil carnitina y shCoA. La palmitoil carnitina es transportada a la membrana mitocondrial interna, en donde es reconvertido en palmitoil-CoA mediante la carnitil palmitoil-CoA transferasa II (véase **Figura 5**).

#### 2.3.1.1.2. Genética de la ACACA.

La Acetil-CoA carboxilasa ha sido clonada y secuenciada en varias especies. La primera especie en la que se aisló su ADNc fue en rata describiendo una secuencia de 7035 pares de bases, que codifica una proteína de 2345 aminoácidos, con una masa molecular de 265.220 Da (López-Casillas *et al.*, 1988). Estos autores, comprueban la existencia de una copia del gen por juego de cromosomas haploides.

Figura 5. Localización de la acetil-CoA carboxilasa  $\beta$ .



Posteriormente, se estudio la región 5' no traducida (López-Casillas y Kim, 1989, López-Casillas *et al.*, 1989, Luo *et al.*, 1989, Luo y Kim, 1990), describiendo dos tipos de ARNm (véase Figura 6):

1. Tipo I: En hígado y en tejido adiposo se aislaron dos tipos de ARNm. Tras el estudio de la región 5' del gen, se demostró que esta diferencia se debe a la existencia de 4 exones que no se traducen a proteína. Existe splicing diferencial, de forma que los ARNm del tipo I, van a presentar el exón 1. Este exón 1 tiene un promotor clásico con una caja TATA en la posición -25 y una caja CAAT en la posición -61 (véase Figura 7). De esta forma,

se encuentran dos tipos de ARNm, uno que posee los exones 1-4-5 (que es el primer exón que se traduce) y otro con los exones 1-5 en su región 5'. La mayor expresión de este promotor tiene lugar en condiciones lipogénicas.

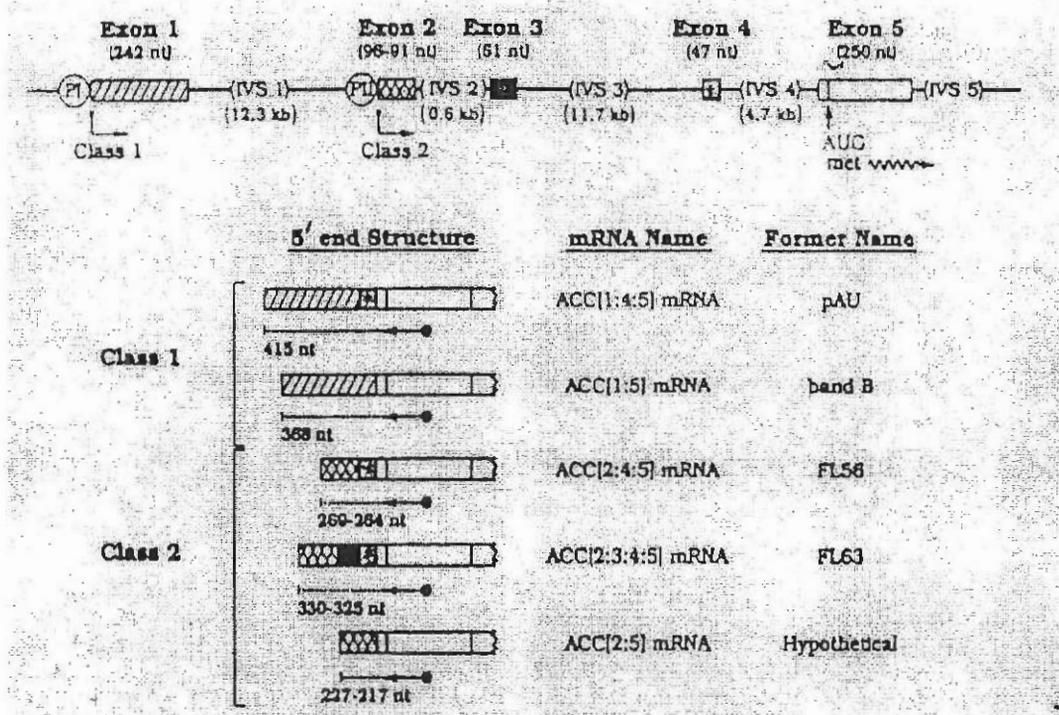
2. Tipoll: En la glándula mamaria se observaron 3 tipos de ARNm, que presentan el exón 2 (no presentan el 1). En este exón 2 encontramos un segundo promotor que no posee caja TATA ni CAAT. Este promotor presenta 5 motivos de repetición G/C (islas GpC), que es típico de los factores de transcripción Sp1 (Chretien *et al.*, 1988). Además, posee unas secuencias repetidas 3 veces anteriores a las repeticiones G/C ("11, 13 mer enhancer elements"). Estos promotores son típicos de los llamados genes porteros ("house keeping gene") (véase **Figura 7**). Los tres tipos de ARNm que vamos a encontrar son con los exones 2-3-4-5, 2-4-5, 2-5 en la región 5' del gen. Este promotor se expresa en condiciones normales y lipogénicas.

En ratas en ayuno, no existe transcripción de acetil-CoA carboxilasa ni en hígado ni en grasa. Tras realimentar a la rata, se observa en tejido adiposo la aparición de la formas 1-4-5 en mayor cantidad que la 1-5. En hígado la primera forma en aparecer es la 2-4-5, para a las 6 horas aparecer la forma 1-4-5, siendo su actividad máxima a las 24 horas de alimentación. En la glándula mamaria, antes del parto, sólo se observa la forma 2-4-5, tras el parto se observa la presencia de la 2-4-5- y la 2-3-4-5 (Kim y Tae, 1994).

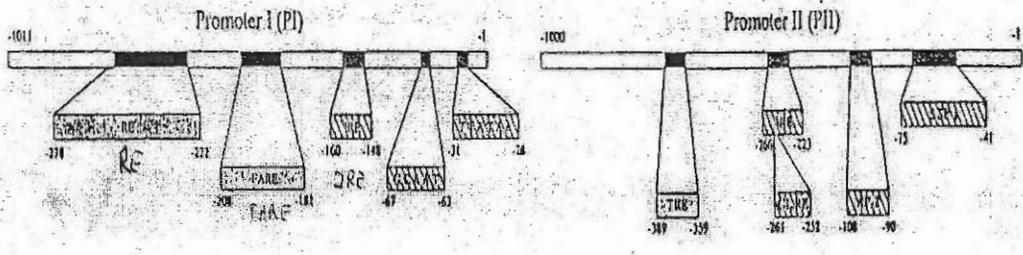
Takay *et al.* (1988), estudiaron la secuencia del gen en pollo, que codifica para una proteína de 2324 aminoácidos (262.706 Da). Pitel *et al.* (1998), mapean la ACACA en un microcromosoma de pollo. En levadura el gen se denominó Fas3 porque se consideraba que era parte del complejo de la ácido graso sintetasa. Se encontró que la homología en la

zona carboxi terminal era de un 68% con el pollo y de casi un 100% con la rata, siendo mayor la conservación de ésta enzima que de la sintetasa de ácidos grasos (Al-Feel *et al.*, 1992, HaBlacher *et al.*, 1993).

**Figura 6.** Estructura de la región 5' de la acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$  (ACACA). Distintos tipos de ARNm, según los exones del extremo 5' que se transcriben.



**Figura 7.** Estructura de los dos promotores estudiados en la acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$ .



En la especie humana, Ha *et al.* (1994), clonaron y secuenciaron el gen, describiendo una secuencia de 7020 nucleótidos que codifican 2340 aminoácidos (264.575 Da). Se observó que la homología con rata era de 85% y 90% en nucleótidos y aminoácidos respectivamente. Al igual que en la rata, encuentran dos tipos de ARNm dependiendo del splicing diferencial en el extremo 5' del gen:

1. Tipo I: Exones 1-4-5 (es el primer exón que se traduce) y 1-5, siendo el primero de ellos más abundante.
2. Tipo II: 2-4-5 y 2-5. En este caso el primer ARNm también es el más abundante. Los promotores encontrados son similares a los descritos en la rata.

La homología encontrada en estos primeros 5 exones es de 40, 74, y 85% para el exón 1, 2, y 4-5 respectivamente.

Posteriormente, Abu-Elheiga *et al.* (1995) y Widmer *et al.* (1996) pusieron en evidencia la existencia de otro gen de la acetil-CoA carboxilasa de 7038 nucleótidos que codifican 2346 aminoácidos (264,737 Da), que mapean en el cromosoma 17 pero en una región distinta (q12) a la mapeada por Milatovich *et al.* (1988)(q24). Estas dos isoformas presentan 7 aminoácidos de diferencia, siendo la descrita por Ha *et al.* (1994) más corta. La secuencia aminoacídica presenta una homología del 90%. Estos dos genes codifican dos isoformas, que presentan la misma función, es decir participan en la síntesis de ácidos grasos.

Además, Abu-Elheiga *et al.* (1995), ponen de manifiesto la existencia de otra isoforma de 280 Kda. aproximadamente, que será confirmada por Ha *et al.* (1996). Estos autores, clonan y secuencian este gen que es 114 aminoácidos más largo. Presenta un 75% de homología con la isoforma descrita por Ha *et al.* (1994). Secuencian 7343 nucleótidos que codifican una proteína de 2458 aminoácidos (276.638 Da). Esta isoforma es

denominada ACACB. Los primeros 217 nucleótidos no tienen homología con los primeros 74 nucleótidos de la ACACA (es decir, no presentan homología a nivel del exón 5 de la ACACA). Esta isoforma es importante en la oxidación de los ácidos grasos, y no en la síntesis.

La zona N terminal diferencial entre las dos isoformas, puede jugar un importante papel en la regulación de la oxidación y síntesis de ácidos grasos (Kim *et al.*, 1998). Por lo tanto esta forma estaría asociada a la mitocondria, mientras que la acetil-CoA carboxilasa  $\beta$  sería una enzima citosólica (Abbu-Elheiga *et al.*, 2000).

La acetil-CoA carboxilasa  $\beta$  fue identificada por Thampy (1989), y Trumble *et al.* (1995) a partir del corazón y músculo esquelético de rata respectivamente. Abe *et al.* (1998), clonaron y secuenciaron la ACACB de rata, que presenta una homología del 85% con la descrita en humana. La ACACB es localizada en el cromosoma 12 humano (q24) destacando su presencia en músculo esquelético y corazón, encontrándose también en hígado y glándula mamaria. La forma  $\alpha$  se ha localizado en cerebro y tejido adiposo.

En la especie ovina, Barber y Travers (1995) clonaron y caracterizaron el ACACA en ovino. El gen está formado por una secuencia de 7041 nucleótidos, siendo los ARN transcritos de 9 a 9.4 Kb., observándose homología de 85, 89, 82 y 54 con humana, rata, pollo y levadura respectivamente. Estos autores encuentran heterogeneidad en el extremo 3' de la secuencia, debida principalmente a la poliadenilación. En el extremo 5' la heterogeneidad es producida por la presencia de transcritos de 272 y 319 nucleótidos en la región que no se va a traducir a proteína del ARNm. Barber y Travers (1998), estudian las regiones 5' del ADN que no se traduce encontrando los mismos tipos de ARNm que en rata y humana. A su vez, en el tipo I encuentran un promotor de características similares a los encontrados en el ARNm tipo I de rata y humana. De igual

forma, en el tipo II se aísla un promotor con las mismas características que los que aparecen en el ARNm de tipo II de rata y humana. Sin embargo, en oveja aparece otro ARNm de tipo III que presenta otro promotor distinto a los dos anteriores, en el que además el exón 5 ha sido sustituido por una secuencia de 424 nucleótidos. Estos mismos autores en 1999, estudiaron la expresión del gen durante la lactación, observando la existencia de ARNm tipo I en el que el extremo 5' está formado por los exones 1-4-5 y 1-5, y ARNm tipo II compuesto por los exones 2-4-5 y 2-5 controlados por el promotor 2. En ovejas no preñadas y no lactantes se encuentra que, en tejido adiposo, los ARNm con el promotor 1 representan el 60% del total, siendo el 85% el ARNm 1-5. En lactación se reducen los ARNm, un 50% los ARNm con el promotor 2, y en un 88% los ARNm con el promotor 1 (descendiendo un 90% el ARNm 1-5). En la lactación la expresión de la acetil-CoA carboxilasa disminuye de forma más importante en los ARNm regulados por el promotor 1.

Por último, destacar los estudios sobre la secuencia genómica de este gen llevada a cabo por Marcos *et al.* (1999) en la especie bovina.

En la especie porcina, no ha sido descrita ninguna secuencia de ADN perteneciente a este gen, existiendo algunos trabajos referidos a estudios de expresión de la proteína. Freire *et al.* (1998), estudiaron el efecto de dietas energéticas en la raza grasa Alentejano, que presenta características similares al cerdo ibérico. Observaron que la expresión de la acetil-CoA carboxilasa se incrementa en 3-9 veces más que en condiciones normales con dietas hipercalóricas. Los resultados sugieren que la acetil-CoA carboxilasa no tiene un papel relevante en la grasa intramuscular, aunque si puede tenerlo en los depósitos de grasa intermuscular. A este respecto son interesantes los resultados de Kouba y Mourot (1998), que observaron que con dietas hipercalóricas se incrementa la expresión de la acetil-CoA carboxilasa. Estos resultados coinciden con los de Mourot y Kouba (1999), que encuentran que la acetil-



CoA carboxilasa tiene efecto en el depósito de grasa intermuscular, al igual que otras enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la enzima málica, asociándose esta última con el depósito de grasa intramuscular.

Debido a la función fisiológica de esta enzima nos hace pensar en la existencia de un QTL relacionado con el engrasamiento.

### **2.3.1.2. Maltasa-glucoamilasa (MGAM).**

#### *2.3.1.2.1. Bioquímica de la MGAM.*

Los compuestos almidonados de la dieta están compuestos por dos polisacáridos distintos: amilosa, que es un polímero lineal con enlaces  $\alpha$ -o-D- glucopiranosil-D-glucosa, y amilopectina que es un polímero lineal (enlaces  $\alpha$ -o-D- glucopiranosil-D-glucosa) que presenta ramificaciones con enlaces en las mismas 6-o- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucosa.

Generalmente en la dieta encontramos un 25% de amilosa en amilopectina. La  $\alpha$ -amilasa es la enzima, que se encuentra en las secreciones salivares y pancreáticas, produciéndose la hidrólisis de los enlaces  $\alpha 1 \rightarrow 4$ . En mamíferos, la hidrólisis de los extremos no reductores de los oligosacáridos es llevada a cabo en las microvellosidades de las membranas de las células de la mucosa intestinal, por las enzimas sucrosa-isomaltasa (SIM) y la maltasa-glucoamilasa (MGA) (Semenza y Auricchio, 1989). La especificidad de substratos de ambas enzimas es similar. *In vivo*, SIM realiza el 80% de la actividad maltasa (hidroliza maltosa, maltotriosa, maltitol,  $\alpha$ -glucopiranosidos y  $\alpha$ -F-glucopiranosidos) (1,4-O- $\alpha$ -D-glucanohidrolasa), el 100% de actividad sobre la sucrosa (hidrólisis de sucrosa y turanosa) (D-glucopiranosil- $\beta$ -D-fructohidrolasa) y casi el 100% de actividad sobre la isomaltasa (hidrólisis de panosa,  $\alpha$ -

dextrinas y enlaces 1,6- $\alpha$ -glucopiranosil en la isomaltasa) (1,6-O- $\alpha$ -D-glucanohidrolasa) (Dahlqvist, 1962). La MGA realiza casi el 100% de la hidrólisis de los residuos de amilosa y amilopectina de los enlaces  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 (hidroliza amilosa, amilopectina, glucógeno y enlaces 1,4- $\alpha$ -glucopiranosil en oligómeros) (1,4-O- $\alpha$ -D-glucanohidrolasa), el 1% de la actividad isomaltasa y el 20 % de la actividad maltasa (Kelly y Alpers, 1981).

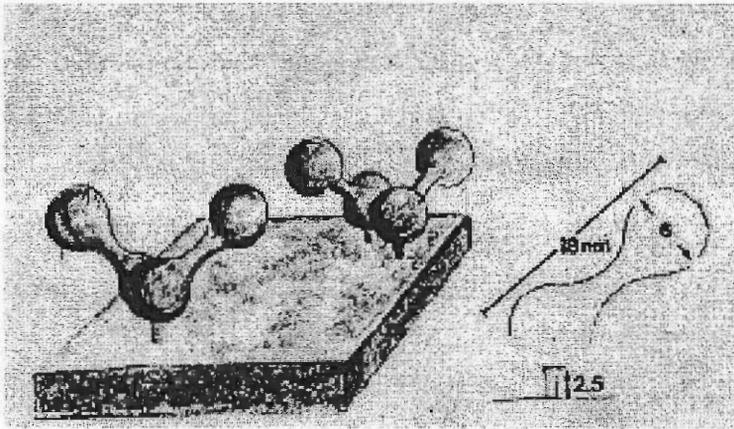
La maltasa-glucoamilasa es sintetizada *in vivo* como una única cadena polipeptídica, que posteriormente es proteolizada *in situ* por proteasas pancreáticas en la membrana (Sorensen *et al.*, 1982). En humana, esta cadena polipeptídica es sintetizada como una cadena única de 210 Kda, no produciéndose posterior procesamiento por las enzimas pancreáticas. Sin embargo, mediante análisis electroforético en condiciones denaturantes se ha visualizado un único polipéptido de 285 kDa, y otro de 335 kDa, debido a la glicosilación de la proteína tras 30 y 60 minutos de la síntesis respectivamente (Naim, *et al.*, 1988). En la especie porcina se sintetiza una cadena polipeptídica de 200 Kda, que tras ser glicosidada y proteolizada por las enzimas pancreáticas origina dos cadenas de 125 y 135 Kda. La maltasa-glucoamilasa es considerada como una enzima homodimérica, en la que el extremo terminal de una de sus unidades sirve de anclaje en la membrana (Norén *et al.*, 1986).

En porcino, esta enzima está anclada a la membrana a través de 25 aminoácidos localizados en la región N terminal. Estos 25 aminoácidos presentan una alta similitud con la secuencia de 25 aminoácidos a través de la cual se ancla a la membrana la sucrosa isomaltasa (Norén *et al.*, 1986), que también sufre un proceso de digestión del polipéptido sintetizado. Estudios en ratón han demostrado que la actividad maltasa se asocia a la subunidad anclada a la membrana mientras que la actividad glucoamilasa lo hace en la subunidad orientada a la zona luminal (Semenza y Auricchio, 1989). En porcino, no se ha podido detectar esta

especificidad de sustrato en las diferentes subunidades. Por tanto, la maltasa-glucoamilasa es una enzima que posee dos sitios activos similares en la misma cadena polipeptídica, actuando de manera paralela y no secuencial (uno en la subunidad de 135kDa y otro en la de 125kDa) (Norén *et al.*, 1986). En otras especies también se ha demostrado la existencia de dos subunidades proteicas de la maltasa glucoamilasa, así como el anclaje en su extremo N terminal (Sorensen *et al.*, 1982, Danielsen *et al.*, 1983).

Destacar que un 80% de los monómeros de esta proteína se asocian formando complejos diméricos ( véase **Figura 8**).

**Figura 8.** Representación gráfica de una micrografía de los complejos diméricos que forma la maltasa glucoamilasa.



Con relación a la función, Nichols *et al.* (1998) hipotetizan que la maltasa glucoamilasa serviría como una ruta alternativa para la digestión de los compuestos almidonados cuando la actividad de la  $\alpha$ -amilasa se encuentra reducida debido a la existencia de malnutrición e inmadurez. Se ha demostrado en ratas malnutridas que la actividad de la maltasa-glucoamilasa está aumentada (Galluser *et al.*, 1991), mientras que en niños con malnutrición (aún inmaduros para producir  $\alpha$ -amilasa en

cantidad suficiente), la maltasa glucoamilasa está reducida (Lebebtal *et al.*, 1994).

#### 2.3.1.2.2. Genética de la MGAM.

El gen que codifica la maltasa-glucoamilasa (MGAM) ha sido clonado y secuenciado solamente en humana (Nichols *et al.*, 1998). El ADNc está formado por 6513 pares de bases, que codifican 1857 aminoácidos (masa molecular de 209,702 Da). Su secuencia presenta un 59% de homología con la sucrosa-isomaltasa en los dos sitios catalíticos. Por último, destacar que este gen ha sido mapeado en el cromosoma 7 de humana mediante el uso de paneles de híbridos somáticos. Para este fin se utilizó 147 pares de bases de la región EST del extremo 3' (GS1365) (Schuler *et al.*, 1996).

Como en el caso anterior la función de esta enzima nos hace suponer que este gen puede presentar un QTL candidato a crecimiento y por lo tanto a cantidad de carne producida. Diversos fenotipos de la enzima podrían producir un mayor aprovechamiento de los compuestos almidonados, produciendo mayores crecimientos y mejores índices de conversión.

#### 2.3.1.3. Proteinquinasa 98 porcina (ppk98).

##### 2.3.1.3.1. Bioquímica de la ppk98.

La protein quinasa porcina 98 es una enzima poco estudiada en las distintas especies. Tras estudiar la secuencia proteica de esta enzima observaron homologías cercanas al 100% entre la ppk98 y la proteína precursora de la endoplasmína (proteína reguladora por la glucosa de 94 kDa) (GRP94). Esto nos hace suponer que ambas enzimas son la misma (Genbank Q29092 para la GRP94 y S38902, CAA62352 para la ppk98).

Estudiando su secuencia y comparándola con humana se observa que tiene una homología superior al 85% con la enzima TRA1 (antígeno de rechazo tumoral gp96).

La endoplasmina (GRP94) o ppk98 es una glicoproteína presente en el retículo endoplásmico. Las proteínas GRPs (proteínas reguladas por glucosa) son inducidas por estrés y están muy relacionadas con las proteínas de choque por calor (heat shock proteins, HSPs) (Wooden y Lee, 1992). En particular la GRP94 es una proteína de 94 kDa también denominada Erp94 (Mazzarella y Green, 1987) o endoplasmina (Koch *et al.*, 1986). No existe un conocimiento exacto de la función de esta proteína, pero si se han propuesto varias actividades entre las que podemos destacar:

1. Actividad chaperona, ya que se ha observado el estímulo de su síntesis debido a la acumulación de proteínas mal plegadas (Kim *et al.*, 1987). Melnick *et al.* (1992) han descrito que la GRP94 y GRP78 participan en el plegado y unión de los intermediarios de las nuevas cadenas de inmunoglobulinas formadas. Además, la GRP94 presenta posterior actividad en el procesado de estas cadenas.

2. Otra actividad que se le ha asignado a la GRP 94 es ATPasa (li y Srivastava, 1993).

3. Capacidad de unión al calcio del retículo endoplásmico, que es el principal almacén del mismo (Koch *et al.*, 1986). Dechert *et al.* (1994), aislaron del cerebro de cerdo esta proteína quinasa que presenta alta homología con otras proteínas inducibles cuando se somete a la célula a estrés por calor. Esta enzima ha sido también aislada en músculo cardíaco y esquelético (Cala y Jones, 1994), verificándose que en condiciones normales es 5 veces más

abundante en músculo cardiaco que en músculo esquelético. Además, en condiciones de estrés celular presenta un incremento de su concentración tres veces en ambos tejidos (Vitadello *et al.*, 1998). Por tanto, esta enzima podría tener un importante papel en la homeostasis intracelular de calcio (Brostrom *et al.*, 1990) y en el tráfico de proteínas (Gething y Sambrook, 1992). En el momento en que la célula es sometida a estrés (depleción de calcio intracelular o cualquier otra cosa que suponga una disfunción del retículo endoplasmático), el nivel de la misma es de 10 a 25 veces más superior que en condiciones normales (Kim *et al.*, 1987).

4. Otra de las funciones que se le atribuyen a esta enzima es la presentación de antígenos (Srivastava y Old, 1988). En humana este antígeno es conocido como TRA1 (Genbank X15187).

5. Por último, a esta enzima también se le han asociado otras funciones como el corte y secreción de proteínas (Melnick *et al.*, 1994).

#### 2.3.1.3.2. Genética de la *ppk98*.

En cuanto a la estructura genética, la secuencia de ADN del gen ha sido descrito en porcino, y se encuentra disponible en la base de datos del Genbank (X90848). La descripción del ADNc del gen fue realizada por Dechert *et al.* (1994), y del ADN genómico por Koning *et al.* (1997) en porcino. Estos últimos autores encuentran una gran homología en el primer intrón del extremo 5' del gen con el gen TRA1 también denominado GRP94 en humana, lo que les hace concluir que o bien ambos genes son el mismo pero en dos especies distintas o tal vez representan una familia de proteínas que están muy relacionadas entre sí. Al igual que en humana en ratón también se ha descrito el gen TRA1, presentando una elevada homología en su ADNc con el *ppk98* porcino.

En humana y ratón se han localizado físicamente el gen TRA1 en los cromosomas HSA12 y MMU10.

La importancia de esta enzima radica en la multitud de funciones celulares que acabamos de exponer. En principio, también esta enzima podría tener un papel como QTL en caracteres productivos o de calidad, debido a su relación con la resistencia al estrés celular. Hay que destacar, que algunos autores han asociado el estrés a la calidad de la carne y a una disminución de los caracteres productivos y por lo tanto de la cantidad de producción (Grobet *et al.*, 1992).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

CONSEJO DE LA CIUDAD DEL

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

La presentación del presente capítulo viene supeditado a la presentación del apartado de resultados y discusión. Como más tarde se verá, dicho apartado, se presenta en forma de artículos y patentes. Por ello, en este apartado describiremos el material y la metodología básica utilizada para la elaboración del presente trabajo. Para cada artículo o patente realizaremos las consideraciones que sean oportunas para la comprensión del mismo, teniendo en cuenta que en los distintos manuscritos del apartado Resultados y Discusión, se explica la correspondiente metodología.

#### **3.1. AUTENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS.**

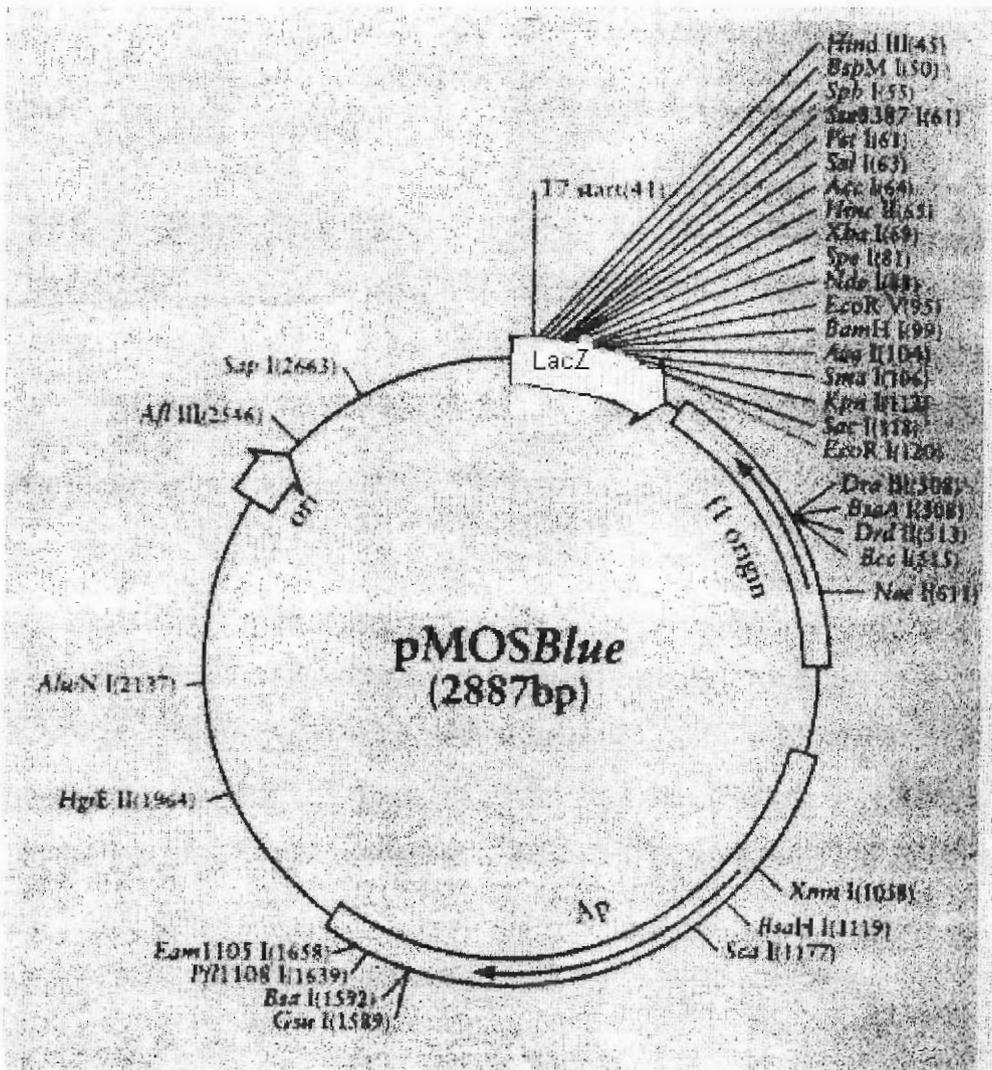
##### **3.1.1. Detección y caracterización genética de nuevos marcadores**

**3.1.1.1. Aislamiento de secuencias repetidas mediante el método I.R.A.R.S. (Isolation Random Amplification of Repetitive Sequences) (Manuscrito 1, patente 1).**

Con el objetivo de buscar secuencias repetidas que puedan utilizarse en la autentificación de los alimentos se ha puesto a punto una técnica para el aislamiento de dichas secuencias que podrían ser utilizadas como sondas especie-específicas (véase **manuscrito 1**). Mediante esta técnica también se han aislado diversos fragmentos, que tras conocer y estudiar su secuencia, pueden presentar variabilidad, y por lo tanto ser utilizados para completar el mapa genético porcino.

El plásmido utilizado para clonar los distintos fragmentos aislados es el pMosblue (**Figura 9**).

**Figura 9.** Plásmido pMosBlue. En la figura se observa el mapa de restricción del plásmido. El sitio de inserción del fragmento de ADN aislado será clonado dentro de LacZ.



La secuenciación de los fragmentos aislados se realizó de forma manual por el método de Sanger *et al.* (1977) utilizando métodos radioactivos. Para este fin se utilizó el Kit de Amershan-Pharmacia "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit". La reacción de secuenciación se realiza en 4 tubos marcados con Adenina, Citosina, Guanina y Timina con 2.5  $\mu$ l de la mezcla de terminación ddA

(didoxiadenina), ddC (dideoxicitosina), ddG (dideoxiguanina) y ddT (dideoxitimina) respectivamente. Estas mezclas de deoxi-nucleótidos contienen cada deoxi-nucleótido a una concentración de 150  $\mu\text{M}$  y el dideoxinucleótido correspondiente a 1.5  $\mu\text{M}$ . A estos tubos se les añade una mezcla (que contiene la taq DNA polimerasa, el ADN a secuenciar, los cebadores, dNTPs, [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP y tampón de la taq) que tras unir el cebador al ADN realiza la extensión, produciendo ADN de distinta longitud dependiendo de dónde se ha incorporado el ddNTP. Para esta reacción es necesario partir de una mayor cantidad de ADN (2-5  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico). Una vez unido el cebador a nuestro fragmento de ADN se realiza una extensión a 60°C durante 5 minutos.

Una vez finalizado la extensión en los 4 tubos se añade una solución de parada que contiene 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% bromofenol azul y 0.05% de xylene cianol FF. Estas muestras pueden congelarse hasta el momento de cargar el gel de secuencia. Los distintos fragmentos obtenidos tras la reacción de secuencia se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%.

La composición del gel es la siguiente:

Urea	33.6 g.
Agua desionizada	20.4 ml.
Solución TBE 5X	16 ml.
Acrilamida 40%	14.2 ml.
TEMED	120 $\mu\text{l}$
Persulfato de amonio	144 $\mu\text{l}$ .

El gel se deja polimerizar durante una hora y, antes de cargar las muestras, se somete a un recorrido de aproximadamente 30 minutos. El voltaje utilizado en el corrido electroforético es de 65 V constantes. Con

ello se consigue distribuir de manera homogénea las cargas a lo largo del gel y alcanzar una temperatura de 45-50°C, necesaria para una óptima electroforesis.

Tras el recorrido, se desnaturalizan las muestras a 80°C durante 5 minutos e inmediatamente después se cargan de 2 a 4  $\mu$ l. En el tiempo que transcurre hasta que se cargen todas las muestras, estas deben de permanecer en hielo para evitar la renaturalización. Normalmente se carga la misma secuencia 3 veces con un interbalo de 1 hora 30 minutos lo que nos permitirá leer con claridad un fragmento de 300-400 pares de bases.

Finalizada la electroforesis, el gel se seca 80°C durante 25 minutos en un secador de vacío (Bio-Rad "model 583 Gel Dryer"), y se pone en contacto con una placa radiográfica. El tiempo de impresión de la placa variará de unas pocas horas a algún día dependiendo de la antigüedad de la radioactividad utilizada.

### **3.1.1.2. Caracterización genética de los marcadores obtenidos.**

Para el estudio de la variabilidad de los microsatélites aislados mediante el método I.R.A.R.S. (**manuscrito 1**) se realizaron PCRs radiactivos (**manuscrito 2**). Antes de realizar el PCR marcado con radioactividad, se puso a punto las condiciones de amplificación y los ciclos adecuados para la misma sin radioactividad. La visualización de la amplificación de este PCR se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando como marcador de talla 1 kb DNA Gibco. En el caso del marcaje radioactivo, las condiciones electroforéticas y el gel realizado para visualizar los resultados se realizó en las mismas condiciones que para la secuenciación.

Su caracterización se realizó estudiando su polimorfismo en cuanto a número de alelos, heterocigosidad y PIC (contenido de información polimórfica) (Botstein *et al.*, 1980). Para estos parámetros se ha utilizado el programa BIOSIS, en el caso del valor PIC se ha utilizado la siguiente fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Siendo  $p_i$  y  $p_j$  las frecuencias de los alelos  $i$  y  $j$  respectivamente, y  $n$  el número total de alelos.

### 3.1.1.3. Cartografía de los marcadores obtenidos.

Los distintos marcadores han sido localizados en el mapa genético porcino, realizándose mapeo físico y/o genético. Comentaremos brevemente cada método.

#### 3.1.1.3.1. Mapeo físico por híbridos somáticos.

Para la localización física de los marcadores obtenidos se ha utilizado el método de híbridos somáticos.

Los híbridos somáticos utilizados en el presente estudio fueron contruídos y caracterizados por el I.N.R.A. de Toulouse (Yerle *et al.*, 1996). Dicho panel está compuesto por 27 clones. Seis clones son independientes y uno deriva de estos 26. Para su construcción se fusionaron líneas de hamster chino (Wg3hC12), de ratón (C11D), con células porcinas (Gellin *et al.*, 1980). Los híbridos del 20 al 27 proceden de fusiones de células porcinas con células de ratón, mientras que los híbridos restantes proceden de fusiones de células porcinas con células de hamster (véase **figura 10**).

### 3.1.1.3.2. Mapeo físico por hibridación *in situ* fluorescente.

En el caso de los **manuscritos 7, 8 y 9** para la localización física de los genes ACACA, MGAM y ppk98, se realizó mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente. Pasamos a describir a continuación los métodos más detalladamente.

Aislamiento de la secuencia específica. Para la metodología específica de cada gen, véase manuscrito 7 para la ACACA, el manuscrito 8 para la MGAM y el manuscrito 9 para la ppk98. En el caso del aislamiento de la secuencia específica de la ACACA y MGAM, se utilizaron muestras sanguíneas de animales de la raza Landrace x Large White. La extracción del ADN se realizó según la técnica descrita por Lahiri *et al.* (1992). Tras realizar la reacción de amplificación (cebadores descritos en los manuscritos 7 y 8), y el corrido electroforético correspondiente la banda amplificada se extrajo utilizando el kit de Gibco BRL (Concert<sup>tm</sup> Rapid Gel Extraction System). Dicho fragmento fue clonado utilizando el vector pMOSBlue contenido en el kit de Amersham Pharmacia PMOSBlue blunt ended cloning kit.

Posteriormente se realizó una siembra del clon en medio sólido, para posteriormente realizar un cultivo líquido de una de las colonias crecidas en medio sólido. El medio de cultivo utilizado fue LB + agar/ampicilina (25µg/ml). En medio líquido no se adiciona agar. La composición del medio de cultivo LB es la siguiente:

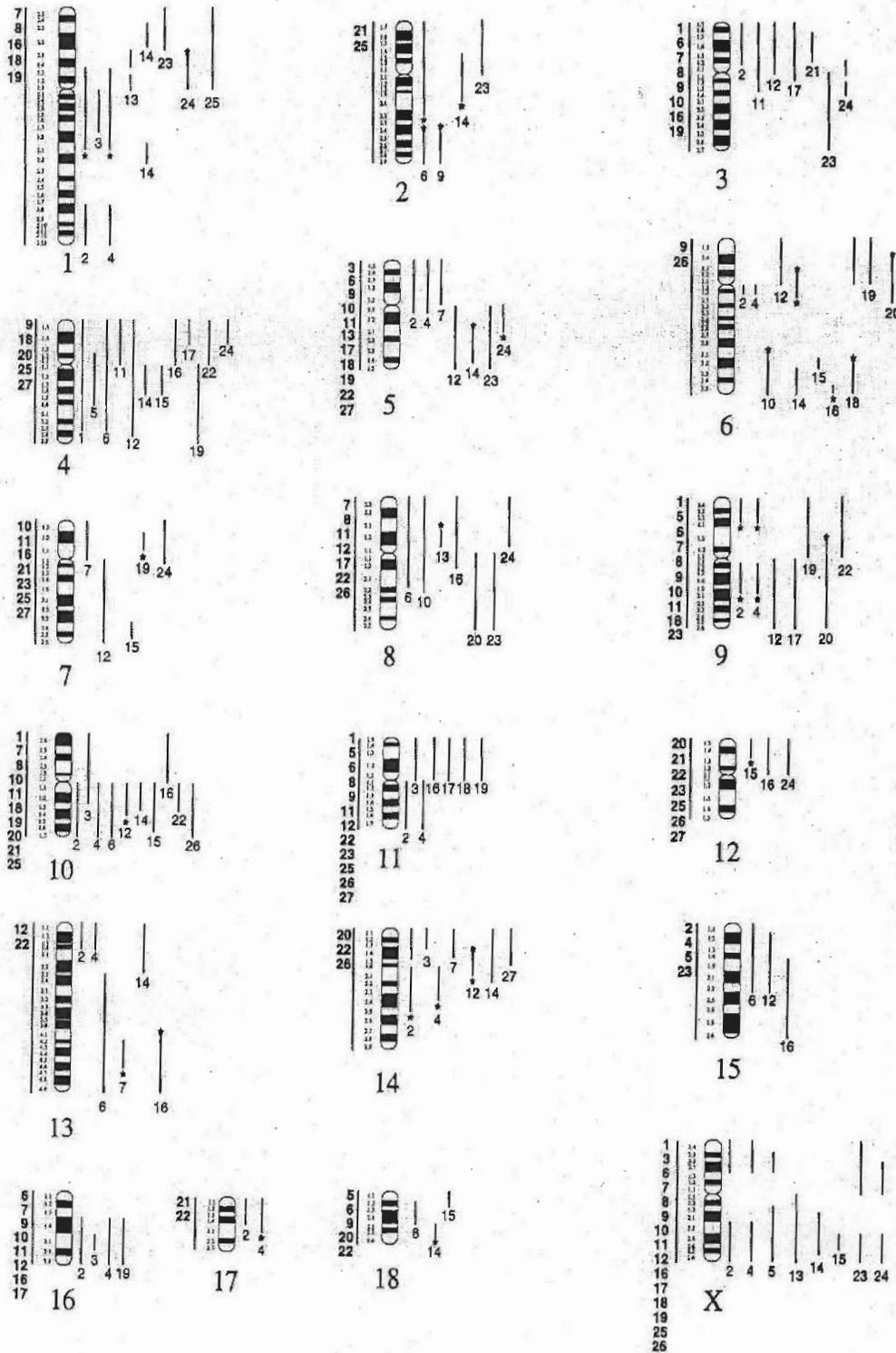
10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

10 g de cloruro sódico

Agua hasta un volumen final de 1 l. Posteriormente se lleva la solución a pH 7.0, y se esteriliza en autoclave.

Figura 10. Panel de híbridos somáticos y caracterización citogenética de los 27 clones que forman el panel de híbridos somáticos porcinos (Yerle et al., 1996).



Por último, se realiza una miniprep alcalina (Maniatis *et al.*, 1989) de 1.5 ml, para obtener el plásmido con el inserto. La secuenciación de los plásmidos para ambos genes se realizó manualmente (Sanger *et al.*, 1977). En nuestro caso utilizamos un kit de Pharmacia Biotech (ALFexpress™, AutoCycle Sequencing Kit™), mediante métodos radiactivos ([ $\alpha^{32}$ P]dCTP).

En el caso de la ppk98, es importante indicar que decidimos estudiar este gen ya que al utilizar la metodología previamente descrita para aislar la ACACA se aislaron varias secuencias intrónicas de este gen. Tras estudiar la bibliografía referente a este gen y puesto que la secuencia porcina se encontraba descrita en la base de datos (Genbank GI 431943), y tras estudiar su posible importancia a nivel productivo decidimos mapearlo con el objetivo de ver si se localizaba en zonas del mapa genético porcino que tuviesen importancia económica.

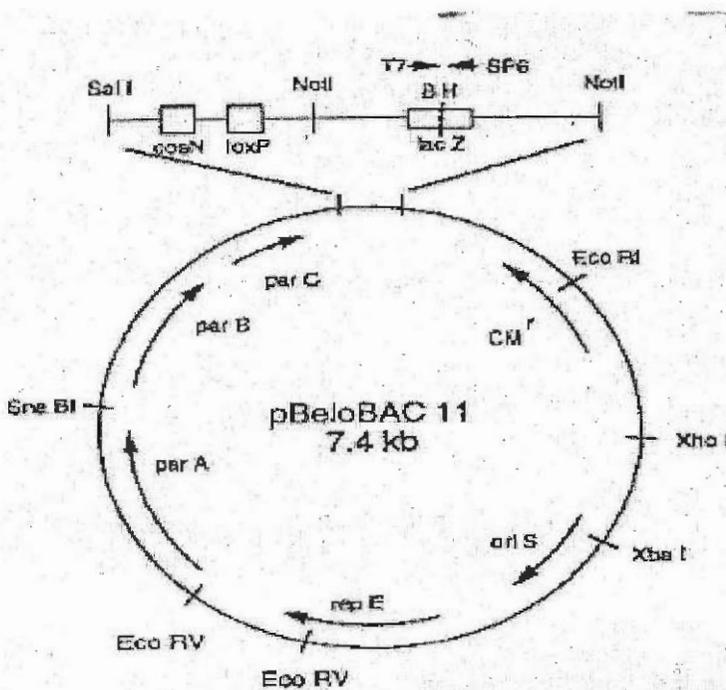
Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Para realizar la localización física de los genes se realizó la técnica de hibridación *in situ* de sondas marcadas con fluorescencia (FISH), siendo necesario utilizar como sonda un fragmento de ADN grande (varias Kb), de forma que se evite la falta de especificidad. Por este motivo, para realizar la localización física mediante FISH es necesario la construcción de librerías en las que, con seguridad, está contenido todo el ADN de la especie. Actualmente, en porcino y en la mayoría de las especies se construyen librerías de BACs (cromosomas artificiales de bacterias). En el presente trabajo, se utilizó la librería de BACs del Roslin Institute (Andersson *et al.*, in press). El vector usado es el pBeloBAC11 (Kim *et al.*, 1996) (**Figura 11**), en cepas de *Escherichia coli* DH10B.

Esta librería ha sido construída a partir de ADN de un animal Large White x Meishan, siendo el inserto de un tamaño medio de 150 kb. Esta

librería consiste en 102000 clones aproximadamente, que están distribuidos en 268 placas microtiter (de 384 pocillos cada una).

La librería se encuentra guardada en un congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Dichos clones son replicados en las mismas placas microtiter a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. El medio de cultivo utilizado es LB. El antibiótico utilizado es cloranfenicol, en una concentración de  $12.5\ \mu\text{g/ml}$ .

Figura 11. Mapa genético del BAC utilizado (pBeloBAC11).



El clon positivo es seleccionado mediante PCR utilizando cebadores específicos porcinos de los genes estudiados (véase metodología concreta en **manuscritos 7, 8 y 9**). Posteriormente, y tras seleccionar el clon positivo y comprobar mediante secuenciación el fragmento de ADN

del gen estudiado, se cultiva en placas de petri el clon positivo a 37°C durante toda la noche, en medio con LB + Agar/Cloranfenicol (12.5 µg/ml). A continuación, se toma una colonia y se realiza un precultivo a 37°C con agitación a 250 r.p.m. en 3-5 ml LB/Cloramfenicol (12.5 µg/ml).

Tras las 8h de precultivo se inoculan 0.5 ml en un cultivo 250 ml LB/Cloramfenicol (12.5 µg/ml). Este cultivo se incuba durante toda la noche a 37°C en agitación a 250 r.p.m. La obtención del ADN del BAC se lleva a cabo mediante una Maxiprep utilizando el kit Quiagen Plasmid Midi Kit protocol con algunas adaptaciones para la extracción del ADN en BACs:

1. Centrifugación de los 250 ml de cultivo bacteriano a 5000 r.p.m. durante 10 minutos.
2. Resuspender el precipitado bacteriano en 10 ml de P1 buffer (25mM de TrisHCl pH 8.0, 50mM de glucosa, 10mM EDTA) a 4°C. Transferrir las bacterias resuspendidas a tubos de 50ml de centrífuga.
3. Añadir 10 ml de buffer P2 (0.2M NaOH, 1% SDS), y mezclar por inversión de los tubos. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Añadir 10 ml de buffer P3 (3M de acetato sódico pH 4.8) a 4°C, mezclando suavemente por inversión. Incubar durante 15 minutos en hielo.
5. Centrifugar a 10000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Se transfiere el sobrenadante a un tubo de 50 ml.
6. Centrifugar nuevamente a 10000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo de centrífuga de 50 ml, previo filtrado con papel Wartmann 3MM estéril.

7. Equilibrar una columna de Quiagen 500 aplicando 10 ml de buffer QBT (kit Quiagen Plasmid Midi Kit protocol) y permitiendo que la columna se vacie mediante la fuerza de la gravedad.

8. Verter el sobrenadante del paso 6 a la columna y permitir que se vacie por la fuerza de la gravedad.

9. Lavar la columna 2 veces con 30 ml de buffer QC (kit Quiagen Plasmid Midi Kit protocol).

10. Eluir el ADN con 3 alícuotas de 5 ml de buffer QF (kit Quiagen Plasmid Midi Kit protocol) calentado a 55°C. Recoger en un tubo de 30 ml.

11. Precipitar el ADN añadiendo 3.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugar a 10000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

12. Eliminar el isopropanol, lavar el precipitado con etanol a 70% y resuspender en 5 ml de agua ultrapura. Transferir a un tubo de microcentrífuga.

13. Añadir 1/10 volúmenes de 3M de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol 100%. Centrifugar en microcentrífuga durante 20 minutos, lavar el precipitado con etanol al 70% y secar a temperatura ambiente.

14. Resuspender en 50-100  $\mu$ l de agua destilada o TE. Almacenar a 4°C.

Para el FISH se utilizó 1  $\mu$ g de ADN del BAC.

La metodología utilizada para el FISH se describe en los **manuscritos 7, 8 y 9.**

### 3.1.1.3.3. Mapeo genético de los marcadores.

El análisis genético se basa en el desequilibrio de ligamiento que se produce al cruzar dos razas porcinas alejadas filogenéticamente. Para ello se analizó el panel de familias del PigMap que corresponden a un cruce de Large White x Meishan (Archibald *et al.*, 1996) y que pueden observarse en la siguiente tabla:

Origen racial		N.H.	N.P.	N.A.	N.T.
Padre	Madre				
L W x M(1)	L W x M	20	2	4(3)	26
L W x M(1)	L W x M	20	2	4(3)	26
L W x M(2)	L W x M	20	2	4(4)	26
L W x M(2)	L W x M	20	2	4(4)	26

LW= Large White; M= Meishan; N.H.= Número de hijos; N.P.= Número de padres; N.A.= Número de abuelos; N.T.= Número total; (1) y (2)= estas familias comparten el mismo padre; (3) y (4)= estas familias comparten los mismos abuelos. Los abuelos son 4 de raza Large White pura y otros 4 de raza Meishan pura.

El análisis de estas familias nos permitió la incorporación de estos marcadores al mapa genético porcino. El análisis se realizó mediante la metodología descrita anteriormente (véase página 72). Las condiciones específicas pueden verse en los **manuscritos 2** para los marcadores s0614 y s0616, **7** para la ACACA y **8** para la MGAM.

El aislamiento y caracterización de los microsatélites relacionados con los genes ACACA y MGAM (**manuscritos 7 y 8**) se realizó a partir de los BACs utilizados para la realización del FISH. Para el aislamiento de dichos microsatélites se realizó subclonación de los fragmentos digeridos con diversas enzimas de restricción que resultaron positivos a la

diversas enzimas de restricción durante toda la noche (Hae III, AluI, PstI, BamHI, HindIII) a una temperatura de 37°C:

1.5  $\mu$ l de enzima

2  $\mu$ l tampón específico de la enzima

8  $\mu$ l de ADN (4 $\mu$ g)

8.5  $\mu$ l de agua

Tras la digestión, se somete la mezcla de digestión a electroforesis en gel de agarosa al 1.3% (20x20 cm) durante 4 horas a 95V, y para comprobar el tamaño de los diferentes fragmentos se corre junto con las muestras digeridas un marcador de talla (fago lambda digerido con HindIII, que nos da unos tamaños de 23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03, 0.56 y 0.13 kb).

El corrido electroforético se visualiza mediante tinción con bromuro de etidio. El gel es digitalizado y fotografiado utilizando un aparato de ultravioleta Gel Doc 1000 de BioRad, utilizando una regla para poder localizar posteriormente los fragmentos en los que se encuentran los microsatélites. Seguidamente se realiza una transferencia capilar en condiciones alcalinas del ADN del gel a una membrana de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N de Amerham), mediante transferencia alcalina durante toda la noche. Tras la misma, se realiza la fijación del ADN mediante radiación ultravioleta durante 90 segundos.

Posteriormente, se realiza la hibridación de la membrana con una sonda marcada radiactivamente, mediante la enzima Klenow, y oligonucleótidos al azar utilizados como cebadores.

Para realizar este marcaje se siguieron las instrucciones y se emplearon los reactivos proporcionados por el kit de amersham-Pharmacia Multiprime DNA labelling system. Los fragmentos de ADN utilizados como sondas ([CA]<sub>25</sub>), se desnaturalizaron a 99°C durante 10

utilizados como sondas ([CA]25), se desnaturalizaron a 99°C durante 10 minutos. En un tubo eppendorf se colocó 25 ng de ADN recién desnaturalizado, 5 µl de hexanucleótidos, 10 µl de una mezcla de dNTP (dATP, dGTP y dTTP), agua destilada esteril hasta conseguir un volumen de 50 µl, 250 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP y 2 unidades de enzima Klenow. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora a temperatura ambiente. El ADN marcado se separó del nucleótido no incorporado mediante cromatografía a través de una columna de Sephadex G-50. Se aplicó la muestra con el ADN marcado y se añadieron 800 µl de TE pH 7.5, recogiendo el eluido en un tubo eppendorf colocado debajo de la jeringuilla. Finalmente se realizó el conteo la radioactividad presente en una alícuota, para comprobar la eficiencia del marcaje.

Para la pre-hibridación de las membranas con el ADN transferido con sondas radioactivas, se utilizó un horno de hibridación. La temperatura de hibridación fue de 65°C durante 1 hora con 30 ml de la solución de hibridación Church+Gilbert:

50 ml de tampón fosfato

35 ml de SDS 20%

15 ml de agua

Para la hibridación se eliminó este tampón y se añadió 30 ml del mismo tampón con la sonda marcada, incubándolo durante toda la noche a 65°C. Tras la hibridación, se realizaron los siguientes lavados a 65°C en el tubo de hibridación:

2XSSC/0.1% SDS 5 minutos

2XSSC/0.1% SDS 15 minutos

0.5XSSC/0.1% SDS 20 minutos

0.3XSSC/0.1% SDS 15 minutos.

Al finalizar los lavados los filtros se expusieron en unas placas de sensibilidad durante 2-3 horas. Estas placas fueron introducidas en un aparato denominado Phosphorimager (Molecular Dynamics), que es capaz de detectar la radioactividad absorbida por las placas de sensibilidad, y realizar una digitalización de la intensidad de señal de las distintas membranas. El paquete informático utilizado fue Imagequant versión 3.22.

Posteriormente, tras identificar los fragmentos del BAC que contienen los microsátélites (mediante medición en cm de la posición de la señal positiva y comparación con la imagen del gel de agarosa), se procede a realizar la digestión de los BACs con las mismas enzimas, para obtener el mismo patrón de restricción que en la electroforesis que se transfirió a la membrana. Realizando la electroforesis en las mismas condiciones, se extraen las bandas identificadas como positivas (kit de extracción de ADN de agarosa de Quiagen) para proceder a su clonación, eligiendo las bandas que tenían un tamaño aproximado de 1Kb, para facilitar su posterior clonación y secuenciación.

Para la clonación el vector utilizado es el plásmido pBlueScript que presente un gen de resistencia a la ampicilina, digeridas con las enzimas utilizadas para la digestión de las bandas positivas extraídas (BamHI y EcoRV). Se utiliza 1  $\mu$ g de pBlueScript, 2  $\mu$ g del tampón de la enzima, 1.5  $\mu$ g de enzima y hasta 20  $\mu$ l de agua. La temperatura utilizada fue de 37°C durante toda la noche. Posteriormente se añadió fosfatasa y se incubó a 37°C durante 1 hora.

El vector digerido se purificó con el kit de Quiagen Quiaquick PCR para eliminar sales e impurezas. La ligación de los fragmentos positivos para el microsátélite y el vector se realizó de la siguiente forma:

1  $\mu$ l de tampón de ligación

1  $\mu$ l (100 ng de vector)



1  $\mu$ l del ADN extraído

1  $\mu$ l de ligasa

6  $\mu$ l de agua

La mezcla de ligación se incubó a 37°C durante 3 horas, en el caso de la enzima BamHI y toda la noche a 4°C para la enzima EcoRV. Por cada enzima y gen se realizaron 5 reacciones de ligación.

Posteriormente se procedió a la transformación utilizando cepas competentes de *Escherichia coli* de Amerham Pharmacia. Para la transformación se incorporan 1  $\mu$ l de la mezcla de ligación a 100  $\mu$ l de células competentes, dejándolas en hielo durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo las células son sometidas a un golpe de calor (42°C durante 45 segundos). Mediante este proceso se favorece la introducción el plásmido en las bacterias.

Como la resistencia a antibióticos no se produce de forma inmediata, en un primer momento se cultivan las células en 900  $\mu$ l de medio LB sin antibiótico a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo de precultivo, se siembran las bacterias transformadas en placas de cultivo (50-100 $\mu$ l por placa) y se incuban a 37°C durante toda la noche. La composición del medio de cultivo es la siguiente:

10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

10 g de cloruro sódico

15 g de agar

Agua hasta un volumen final de 1 l.

Posteriormente se lleva la solución a pH 7.0, y se esteriliza en autoclave. Se deja enfriar hasta 40-50°C y se añade ampicilina hasta una

concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se ponen 30-35 ml de medio por placa y se deja enfriar.

Debido a la posibilidad de que ciertos clones contengan secuencias de tamaño similar al fragmento que contiene el microsatélite, hay que realizar un nuevo screening mediante hibridación con una sonda marcada radioactivamente en las colonias bacterianas. Para este fin, las bacterias que crecen en estas placas son sembradas en placas de 96 pocillos. Estas placas contienen medio de cultivo similar al anterior pero líquido, incubándose a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, con una placa de 96 púas que encaja con la placa de 96 pocillos se siembran sobre una membrana de nylon colocada suavemente sobre una placa de Petri (20x20cm) incubando a 37°C, para que durante toda la noche tenga lugar el crecimiento bacteriano. Al día siguiente se procede a la desnaturalización y fijación del ADN de estas colonias bacterianas. Para este fin se procede a realizar los siguientes lavados:

1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH durante 7 minutos

1.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 7.5 durante 5 minutos

1.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 7.5 durante 5 minutos

Aclarar con SSC2X

Tras la fijación con ultravioletas del ADN durante 90 segundos, se procedió a la hibridación, el marcaje de la sonda y los lavados, siguiendo el protocolo realizado en la primera hibridación de la sonda con los fragmentos de ADN digeridos de los BACs, para finalmente visualizarlo con el aparato Phosfoimager (páginas 80-81).

Las colonias que han dado signo positivo a la hibridación con la sonda, se cultivan en medio líquido con el fin de conseguir la cantidad de ADN plasmídico suficiente para ser secuenciado. Para obtener el ADN plasmídico a partir del cultivo se realiza una digestión alcalina a partir de

1.5 ml de cultivo (Sambrook *et al.*, 1989). La secuenciación de los insertos se ha realizado por la empresa MWG BIOTECH, a la cual se le envió el ADN plasmídico, mediante secuenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer), que utiliza fluorescencia que es leída y procesada por el secuenciador automático. La secuenciación es cíclica mediante PCR, y permite obtener secuencias de 1000 pares de bases, a partir de una pequeña cantidad de ADN (50 ng de ADN plasmídico es suficiente). La reacción de secuenciación, como en el caso de la secuenciación manual, está basada en el método de Sanger *et al.* (1977). Los cebadores utilizados son:

Universal: 5'ACATTTTGCTGCCGGTCA3'

Reverso: 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'

La información obtenida de estas secuencias se utilizó para sintetizar cebadores específicos con el objetivo de testar la variabilidad de los microsatélites. Una vez comprobado que tenían polimorfismo se procedió a localizarlos genéticamente. El mapeo genético se basa en el desequilibrio de ligamiento que se produce al cruzar dos razas porcinas alejadas filogenéticamente. Para ello se analizó el panel de familias del PigMap que corresponden a un cruce de Large White x Meishan (Archibald *et al.*, 1996) (véase apartado 3.1.3.2. de la memoria). Este análisis se realizó mediante métodos radiactivos. Las condiciones electroforéticas y la realización del gel fueron similares a las expuestas para el testaje de los microsatélites del manuscrito 2.

Las condiciones específicas para cada uno de los marcadores fueron las siguientes:

ACACA: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores 30 segundos a 58 °C y elongación a 72°C durante 30 segundos.

MGAM: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores 30 segundos a 52 °C y elongación a 72°C durante 30 segundos.

Para ambos genes la mezcla de amplificación está compuesta por 30 ng de ADN, 2 mM de magnesio, 200 µM de dNTPs, 250 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, 2 µl de tampón de la *taq* y 2 unidades de enzima *taq* polimerasa, en un volumen final de 20 µl.

Tras estudiar los distintos polimorfismos, se realizó análisis de ligamiento utilizando el programa CRI-MAP (Green *et al.*, 1994), como se indica en el **manuscrito 7 y 8**. El programa realiza todas las posibles comparaciones entre el nuevo marcador y cada uno de los descritos en la base de datos, obteniendo la frecuencia de recombinación. Los marcadores para los que se obtenga un lod score mayor de 3 presentan ligamiento con el gen estudiado.

### **3.1.2. Identificación de las especie que componen los productos cárnicos (manuscrito 3 y manuscrito 4).**

Mediante la técnica descrita y detallada en el **manuscrito 1** (véase apartado de resultados y discusión) se aisló una secuencia que fue utilizada como sonda específica de porcino.

El material y métodos del estudio de sensibilidad y especificidad de la muestra en distintos alimentos se describe en los **manuscritos 3 y 4**, igualmente en el **manuscrito 3** se describe el material y métodos utilizados para los estudios de cuantificación en distintos alimentos.

El análisis estadístico utilizado para la cuantificación de carne porcina en los alimentos se realizó utilizando el paquete informático Statview, con

el que se realizó una regresión múltiple con el fin de obtener una ecuación adecuada.

### **3.1.3. Autenticación en quesos y patés (manuscrito 5 y 6).**

Dentro del objetivo referente a la identificación de especies, nos planteamos la utilización, dadas las características de la técnica, del RAPD-PCR para diferenciar especies filogenéticamente cercanas en quesos y patés.

En el **manuscrito 5 y 6** se presentan el material y métodos específicos utilizados para identificar la procedencia de especie de distintos quesos semicurados y curados así como de patés analizados.

## **3.2. CANTIDAD Y CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS.**

Como ya mencionamos en los objetivos propuestos para estudiar la cantidad y calidad intrínseca en los alimentos de origen porcino, se ha intentado aislar y estudiar marcadores que por su función bioquímica y fisiológica, pueden estar relacionados con características como la grasa, Kg de carne producida y otros caracteres de calidad de los alimentos.

Nuestro trabajo se ha centrado en tres marcadores: ACACA, MGAM y ppk98. La metodología para aislar, y localizar estos genes se ha expuesto en el apartado 3.1.1.3. de la memoria.

### **3.2.1. Estudio del posible QTL/ETL en la ACACA y la MGAM.**

La posible asociación entre los distintos fenotipos de los microsatélites aislados en la ACACA y la MGAM y los caracteres productivos y de calidad, se estudio en las familias de referencia del PigMaP que corresponden a un cruce de Large White x Meishan y que fueron

construidas para este fin (Archibald *et al.*, 1996). En la tabla siguiente se puede ver la composición de las familias analizadas en este trabajo.

Origen racial		N.H.	N.P.	N.A.	N.T.
Padre	Madre				
L W x M (1)	L W x M	20	2	4(3)	26
L W x M (1)	L W x M	20	2	4(3)	26
L W x M(2)	L W x M	20	2	4(4)	26
L W x M(2)	L W x M	20	2	4(4)	26

LW= Large White; M= Meishan; N.H.= Número de hijos; N.P.= Número de padres; N.A.= Número de abuelos; N.T.: Número total; (1) y (2)= estas familias comparten el mismo padre; (3) y (4)= estas familias comparten los mismos abuelos. Los abuelos son 4 de raza Large White pura y otros 4 de raza Meishan pura.

Los caracteres medidos y estudiados en estos animales fueron los siguientes:

<b>Calidad de la carne</b>	Espesor de la grasa dorsal, grasa intramuscular, grasa abdominal
<b>Cantidad de carne</b>	Ganancia media diaria, ganancia de peso diario medio hasta 30 Kg, ganancia de peso diario medio hasta 70 Kg, peso al destete.



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

La presentación del capítulo de resultados y discusión será en forma de manuscritos (patentes, artículos publicados, en prensa o enviados para su publicación) acompañados de diversos anexos en los que se especifica detalles relativos a datos que no aparecen en los mismos, como son secuencias, situación actual de los distintos cromosomas, etc. Hemos creído conveniente realizar algunos comentarios, antes de la exposición de estos manuscritos, que agruparemos en dos bloques: la autenticación de los alimentos (apartado 4.1.) y a calidad intrínseca de los alimentos (apartado 4.2.).

##### **4.1. AUTENTIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS.**

Con el objetivo de poder realizar la identificación de posibles fraudes por la existencia de especies no declaradas en el etiquetado de los alimentos, se ha desarrollado un nuevo método de aislamiento de secuencias altamente repetidas en el genoma llamado I.R.A.R.S. (Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences) Mediante este método se han descrito nuevas secuencias correspondientes a regiones repetidas (MIRs, MERs, SINEs y LINEs) (**manuscrito 1**). De las secuencias obtenidas el 94% eran secuencias no estudiadas todavía en porcino, siendo alrededor de un 56% secuencias que presentaron un motivo de repetición. Respecto a la variabilidad, ocho de las secuencias descritas en el **manuscrito 1** presentaban repeticiones con posible polimorfismo. Cuatro de estas secuencias microsatélites fueron testadas para estudiar su polimorfismo. Sólo uno de estos microsatélites resultó monomórfico, otro presentó polimorfismo únicamente en la raza Pietrain, mientras que los otros dos fueron polimórficos (**manuscrito 1 y 2**). Los tres microsatélites que resultaron polimórficos, s0614, s0615 y s0616,

fueron localizados física y genéticamente en los cromosomas SSC8, SSC1 y SSC1 respectivamente.

En los **manuscritos 3 y 4** se describen un procedimiento para detectar la presencia de cerdo en productos procesados y no procesados. El fragmento de ADN utilizado para detectar productos procedentes del cerdo fue aislado mediante el método anterior (I.R.A.R.S.). Este fragmento de ADN es una secuencia que presenta un motivo de repetición tipo SINE, y por lo tanto se encuentra altamente repetido en el genoma. Esta característica hace que la sensibilidad de la técnica sea altísima, aunque en la muestra haya pocas células porcinas. Otra ventaja de este método, es que puede ser aplicado a carnes tratadas térmicamente (autoclavados a 120°C durante 30 minutos), a patés, y a otro tipo de productos como hamburguesas, salchichas, etc. Por otra parte la sensibilidad de esta técnica es extremadamente alta llegando a detectar con 30 ciclos de amplificación hasta un 0.005% de carne de cerdo en vaca. Incluso mediante la utilización de 20 ciclos de amplificación es posible detectar hasta un 1% de contaminación.

Este método permite cuantificar la contaminación presente en carne o paté de cerdo. Con 20 ciclos de amplificación existe una correlación de 0.99 entre la cantidad de cerdo presente en la muestra y la intensidad de las bandas tras el corrido electroforético. De esta forma, se obtuvo una recta de regresión que nos permite cuantificar la contaminación de carne porcina:  $y = 0.918x - 2.221$  (véase **manuscrito 3**).

En este aspecto, nos gustaría resaltar la existencia de patés etiquetados como puros de pato, en los que se encontró más de un 50% de cerdo. Asimismo, el método nos permitió cuantificar en otros patés en los que la etiqueta ya indicaba la existencia de grasa de cerdo, comprobándose con este procedimiento que existía un 26% de grasa o paté de cerdo. La aplicación esta técnica podría ser muy útil a empresas

que quieran dar una marca de calidad a sus productos, o como control desde el punto de vista de los consumidores.

La autenticación de especie en quesos se realizó mediante la metodología RAPD-PCR (**manuscrito 5**). En la bibliografía se han descrito métodos inmunológicos que detectan leche de vaca en los quesos, pero no es posible la diferenciación de leche de otras especies. Con la técnica descrita se puede diferenciar mediante una única PCR la procedencia de la leche que entra a formar parte de los quesos. Como ejemplo, destacar la detección de las tres especies (bovino, ovino y caprino) en quesos compuestos por leche de las tres especies.

De igual forma que en el caso anterior, mediante la técnica RAPD-PCR se estudió la composición de las distintas especies que componen los patés (**manuscrito 6**). Aquí, se detectaron nuevos fraudes. En patés de pato, supuestamente puros, se observó la presencia de cerdo. Esto ya se había puesto de manifiesto, mediante la técnica descrita en el **manuscrito 3**, y nos sirvió para confirmar los resultados. Además, permitió detectar que en paté de pato puro (atendiendo al etiquetado) se introducía productos procedentes de pollo.

Hay que destacar que utilizando los cebadores descritos en los RAPD-PCR, los perfiles electroforéticos encontrados corresponden a los modelos esperados para cada especie, no presentando ningún tipo de polimorfismo ni resultado discordante.

#### **4.2. CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS.**

En este apartado vamos a resumir los resultados encontrados en relación al estudio de los tres genes candidatos a QTLs/ETLs: ACACA, MGAM y ppk98.

En el caso del gen de la acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$  (ACACA) es la primera vez que el gen se ha estudiado en la especie porcina. Se ha aislado, secuenciado y localizado genética y físicamente en el mapa porcino. Dicho gen se ha localizado, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), en el cromosoma 12 porcino. Además, hemos obtenido un microsatélite asociado al gen (S0604), el cual ha presentado 4 alelos, que ha permitido mapearla genéticamente a 40.2 cM del gen de la hormona de crecimiento (GH).

Igual que en el caso anterior, la maltasa glucoamilasa (MGAM) se ha estudiado por primera vez en la especie porcina y hemos aislado, analizado y localizado en el cromosoma 2 del mapa porcino (**manuscrito 8**). Este resultado es muy interesante porque en humana dicho gen había sido localizado en el cromosoma 7, que no presenta homología con el cromosoma 2 porcino. Esto indica que se ha producido una ruptura evolutiva de la homología de este cromosoma con respecto al cromosomas 7 humano (Break point). Asimismo hemos aislado un microsatélite (S0605) que ha presentado tres alelos, y que nos ha servido para localizar la MGAM en el mapa genético porcino.

Sin embargo, tras realizar la asociación entre los resultados de los polimorfismos y los caracteres de producción animal de las familias QTLs del Roslin Institute, no se ha encontrado significación en dicha asociación ni para la ACACA ni la MGAM. Aquí hay que remarcar que un QTL tiene efecto en determinadas familias y no en otras. Por este motivo, y debido a la importancia del gen en el metabolismo se considera muy interesante el estudiar el posible efecto QTL en otras familias. En estos momentos se está estudiando la posibilidades de testar su efecto en un cruce de raza Ibérica con Large White.

Por último, se ha procedido a la localización física del gen ppk98 (TRA1) en el mapa porcino (**manuscrito 9**). Mediante la técnica descrita

en el **manuscrito 1**, varios intrones de la ppk98 se clonaron y secuenciaron. Por este motivo, y por las diversas funciones que a nivel celular parece que posee, decidimos estudiar la localización del mismo en el mapa físico porcino. Realizando comparaciones entre las secuencias de porcino (ppk98), humana (TRA1) y rata (TRA1) se encontraron homologías de alrededor del 90% en casi toda la longitud del ADNc de los genes y en las mismas regiones, lo que hace pensar que son el mismo gen. El gen porcino ppk98 fue localizado mediante FISH e híbridos somáticos en el SSC5. Estos resultados confirman la hipótesis de que el gen ppk98 porcino es homólogo al TRA1 humano y de rata, ya que el TRA1 humano se localiza en el cromosoma HSA12q24.2-q24.3 y el de rata en el MMU10, que presentan homología con el cromosoma porcino SSC5 en su brazo largo (q). Actualmente, queda por realizar el estudio entre un microsatélite del gen ppk98, y su asociación con caracteres productivos.

Handwritten text on the left margin, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

### **4.3. MANUSCRITOS DEL APARTADO DE LA AUTENTIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS.**

APR

**MANUSCRITO 1: Método de búsqueda de marcadores de ADN altamente repetidos en el genoma mediante amplificación al azar (P200000838 Patente 1).**





OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

PATENTE DE INVENCION  MODELO DE UTILIDAD

NUMERO DE SOLICITUD **00000838**

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.

FECHA Y LUGAR DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(1)  SOLICITUD DE ADICION  
 SOLICITUD DIVISIONAL  
 CAMBIO DE MODALIDAD  
 TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA

(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN  
 MODALIDAD .....  
 NUMERO SOLICITUD .....  
 FECHA SOLICITUD .....  
 MODALIDAD .....  
 NUMERO SOLICITUD .....  
 FECHA SOLICITUD .....

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO  
 ZARAGOZA [ ]

(4) SOLICITANTE(S) APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA NOMBRE DNI

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, y en su nombre y representación D. Juan José Badiola Díez, rector de dicha Universidad 30.040.626

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO Ciudad Universitaria, Plaza San Francisco, s/n  
 LOCALIDAD ZARAGOZA TELEFONO 976-56.50.03  
 PROVINCIA ZARAGOZA CODIGO POSTAL 5101015  
 PAIS RESIDENCIA ESPAÑA CODIGO PAIS [ ]  
 NACIONALIDAD ESPAÑA CODIGO NACION [ ]

(6) INVENTOR(ES) (7)  EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR  
 EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR

(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO  
 INVENC LABORAL  CONTRATO  SUCESION

APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
CALVO LACOSTA	JORGE	Española	
OSTA PINZOLAS	ROSARIO	Española	
ZARAGOZA FERNANDEZ	PILAR	Española	

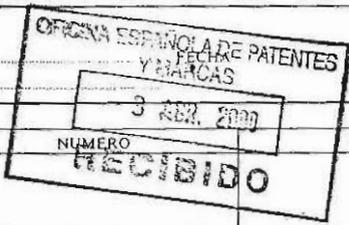
(9) TITULO DE LA INVENCION

METODO PARA LA Búsqueda DE MARCADORES DE ADN ALTAMENTE REPETIDOS EN EL GENOMA MEDIANTE AMPLIFICACION AL AZAR.

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.  SI  NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR .....



(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.  SI  NO

(14) REPRESENTANTE APELLIDOS NOMBRE CODIGO

DOMICILIO LOCALIDAD PROVINCIA COD. POSTAL

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

<input type="checkbox"/> DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS...	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION
<input type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS...	<input type="checkbox"/> PRUEBAS
<input type="checkbox"/> DIBUJOS. N.º DE PAGINAS...	<input type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS
<input type="checkbox"/> RESUMEN	<input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES
<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> COMPLEMENTARIAS
<input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> OTROS

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión: para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

3. Recibido solicitante (con instrucciones)

JUAN JOSE BADIOLA DIEZ



## **MÉTODO PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES DE ADN ALTAMENTE REPETIDOS EN EL GENOMA MEDIANTE AMPLIFICACIÓN AL AZAR.**

La presente invención se refiere al descubrimiento de un método de búsqueda de marcadores de DNA altamente repetidos en el genoma, que se ha denominado I.R.A.R.S. (intensive random amplification of repetitive sequences). Mediante el uso de dicha técnica es posible aislar secuencias altamente repetidas en el genoma como las derivadas de transposición (las cuales se encuentran en su mayoría asociados a microsatélites) y secuencias repetidas en tandem que presentan variabilidad en su longitud. Estos microsatélites pueden presentar polimorfismo en los distintos animales. Para la detección de las regiones repetidas utilizamos la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mediante cebadores que se unan al azar en el genoma. Una vez obtenidas las amplificaciones seleccionamos la banda más intensa, para posteriormente clonarla y secuenciarla.

Estas secuencias son interesantes para su utilización en la creación del mapa genético, estudios evolutivos entre especies y biodiversidad, así como para la asociación de estos marcadores altamente repetidos y polimórficos con QTLs (quantitative trait loci) y ETLs (economic trait loci). Asimismo, otra aplicación interesante es su utilización como marcadores en determinadas patologías que son causadas por anomalías en el número o tipo de repeticiones de dichas regiones. Por último, estas secuencias altamente repetidas pueden ser utilizadas como marcadores específicos de la especie, teniendo aplicación en la detección de células de especie en muestras de distinto origen biológico.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION.**

En los últimos años el desarrollo de los mapas genéticos de las distintas especies animales y humana están adquiriendo una gran importancia, existiendo

diversos proyectos que engloban a distintos países para cada una de las especies que se estudian. En el caso concreto del ganado porcino existe el proyecto PigMap, como aparece recogido en Archibald, A.L. y col., (1995) "The PigMap consortium linkage map of the pig (*Sus Scrofa*)", *Mammalian Genome* 6: 157-175. En estos momentos, interesa la realización de mapas de alta resolución que permitan el conocimiento de zonas poco estudiadas del genoma y su posible relación con caracteres productivos y de interés económico. Es decir, el objetivo consiste en buscar marcadores polimórficos uniformemente repartidos por el genoma, a través de los cuales se pueda llegar al aislamiento, secuenciación y localización de genes concretos relacionados con caracteres de interés económico o enfermedades (ETLs, Economic trait loci), así como marcadores relacionados con caracteres de tipo cuantitativo, más productivos (QTLS, quantitative trait loci). Asimismo, el conocimiento del mapa genético presenta otras utilidades como son estudios de evolución y biodiversidad e identificación de parentescos.

Para lograr estos fines, es necesario la utilización de marcadores de DNA polimórficos, altamente repetidos y dispersos por el genoma. Los marcadores de elección utilizados a lo largo del desarrollo de los mapas hasta ahora han sido: los microsatélites, los LINEs (Long Interspersed Elements) y los SINEs (Short Interspersed Elements). Los microsatélites o STR son secuencias del genoma altamente polimórficas repartidos por todo el genoma que consisten en repeticiones de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos [(A)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub>, (GAG)<sub>n</sub>, (CTGA)<sub>n</sub>], como describió Moran, C. (1993) "Microsatellite repeats in pigs (*Sus Scofra*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes", *Journal of Heredity* 84: 274-289. Entre los métodos utilizados para aislar microsatélites destaca el descrito por Weber, J.L. y May, P.E. (1989) "Abundant class of DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction", *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396., en el que describen un método general para detectar microsatélites, basado en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y en la cartografía comparativa entre especies. En primer lugar se consigue la amplificación entre dos oligonucleótidos específicos que flaquean la región

microsatélite de una determinada especie para posteriormente amplificarlos en otra especie y separar los distintos alelos según el número de veces que se repiten los dos pares de bases, generalmente mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida. Sin embargo, al estar los microsatélites en regiones no codantes, este método presenta el problema de que la zona estudiada puede no estar conservada entre especies. Este problema es mostrado por Milan, D. y col. (1994) "Heterologous amplification obtained on porcine DNA with 657 pairs of primers from Genethon's Human microsatellites", *XXIV International conference of Animal Genetics* 30: 102, los cuales encontraron un 21 % de conservación de secuencias microsatélites entre porcino y humano.

Otro método consiste en la búsqueda al azar de estos marcadores en librerías de DNA genómico digerido en pequeños fragmentos y clonados en plásmidos mediante la hibridación de estos fragmentos con una sonda marcada (esta sonda es una secuencia de ADN con las repeticiones específicas del tipo de microsatélite que se busca). Este método ha sido utilizado para el aislamiento de diversos microsatélites como por ejemplo el descrito por Vaiman y col. (1992) "Characterization of new bovine dinucleotide repeats." *Animal Genetics* 23 (6), 537-541. Los inconvenientes de este tipo de método radican, en primer lugar que es más laborioso que la utilización de la PCR, y es fácil volver a localizar los microsatélites ya descritos por otros autores.

En un principio, otro de los métodos utilizados fue el estudio de las bases de datos localizando en secuencias intrónicas de genes descritos por otros autores para otro tipo de finalidad. Sin embargo, actualmente una vez realizados los estudios por distintos grupos de investigación dichos marcadores ya han sido estudiados y se ve en la clara necesidad de la localización de los mismos por otras tecnologías.

Como ya hemos indicado, otros marcadores altamente polimórficos y repartidos por el genoma son los SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) y los LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) se encuentran en el DNA

repetido disperso en las distintas especies animales. Las unidades de repetición están dispersas en numerosas localizaciones en el genoma y la mayoría de las familias de DNA pertenecientes a esta clase, contienen miembros con capacidad de retrotransposición o transposición a partir de un RNA intermedio. Singer, M. F. (1982) "SINEs and LINEs: Highly repeated short and long interspersed repeat sequences in mammalian genomes" *Cell* **28**: 433-434, clasifica en mamíferos las familias de DNA repetitivo disperso, dependiendo de la longitud de su secuencia consenso en dos clases: SINEs y LINEs.

Weiner, A.M. y col., (1986) "Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transportable elements generated by the reverse flow of genetic information", *Annuals of Reviews of Biochemistry* **55**: 631-661, definieron los SINEs como secuencias cortas (70-300 pb) y repetidas de forma dispersa en el genoma, pudiéndose encontrar más de 100.000 copias de elementos de una familia determinada. Uno de los ejemplos más conocidos de este tipo de secuencias es la familia humana conocida como Alu, si bien, los SINEs han sido descritos en un gran número de especies. De especial interés son los descritos en el ganado porcino Frengen, E. y cols., (1991) "Porcine SINEs: Characterization and use in species-specific amplification", *Genomics* **10**: 949-956.

Lo interesante de este tipo de repeticiones es la existencia en el extremo 3' de una secuencia rica en Adeninas que pueden presentar un polimorfismo en los distintos animales. Así, Economou, E.P. y col. (1990) "The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome", *Proceedings National Academy Sciences* **87**: 2951-2954. describieron una nueva clase de polimorfismos del DNA basada en la variación de la longitud de las colas de Adeninas (pudiendo ser considerados como microsatélites y que en general son denominados SINEVA (sine variable poli A). Estos autores definieron además la potencialidad de otras secuencias que poseen cadenas de poli (A), como los LINEs, Pseudogenes o retroposones, para ser polimórficos.

Ellegren (1993) "Abundant (T)<sub>n</sub> (A)<sub>n</sub> mononucleotide repeats in the pig genome: linkage mapping of the porcine APOB, FSA, ALOX12, PEPN and RNL loci", *Animal Genetics* **24**: 367-372, describió este tipo de polimorfismos en la especie porcina. Estos polimorfismos, generalmente situados en intrones (asociados a genes), pueden ser de gran utilidad para la cartografía por ligamiento de genes ya descritos e incluso localizados físicamente, para los cuales es muy difícil realizar un análisis de ligamiento debido a la falta o escasez de variación en la secuencia codante.

Por otra parte, Hwu, H.R. y col., (1986) "Insertion and or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution", *Proceedings National Academic Sciences* **83**: 3875-3879, afirman que los genomas de los mamíferos contienen unas 50.000 copias de un elemento disperso y de gran longitud conocido como LINE o familia L1. Weiner, A.M. y col., (1986) "Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transportable elements generated by the reverse flow of genetic information", *Annuales of Reviews of Biochemistry* **55**: 631-661, definen el tamaño de este elemento como variable, pudiendo ser mayor de 6 Kb.

A diferencia de los SINEs, las familias de LINEs son más escasas. Además, dentro de las grandes familias se han identificado subfamilias formadas por los procesos de evolución, como indican Hayward y col., (1997) "Recombination creates novel L1 (LINE1) elements in *Rattus norvegicus*", *Genetics* **146**: 641-654. Los elementos de esta familia, en las distintas especies, presentan homología entre sí en fragmentos de longitud considerable. Al igual que las repeticiones Alu, los elementos L1 no se localizan en secuencias codantes.

Para el aislamiento de SINEs y LINEs se realizan procedimientos similares a los realizados en el caso de los microsatélites. Un método consiste en la búsqueda al azar de estos marcadores en librerías de DNA genómico digerido en pequeños fragmentos y clonados en plásmidos, mediante la hibridación de estos fragmentos con una sonda marcada (esta sonda es una secuencia de ADN consenso que se

encuentra en los SINEs y LINEs). De esta manera podemos aislar los clones que contengan el SINE o LINE. Pero de nuevo esta tecnología presenta el inconveniente de ser más laboriosa que la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Como en el caso de los microsátélites, otro método consiste en la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y la cartografía comparativa entre especies, amplificando la zona mediante dos oligonucleótidos específicos que flanquean el LINE o el SINE. Sin embargo, al estar estas secuencias en regiones no codantes, este método presenta el problema de que la zona estudiada puede no estar conservada.

Existen unas técnicas específicas, relacionadas con SINEs y LINEs, utilizadas para la amplificación mediante PCR de ADN contenido entre dos secuencias dispersas. Esta técnica se denomina IRS-PCR (Interspersed Repeat Sequences-Polimerase Chain Reaction). La técnica ha sido descrita tanto en SINEs o Alu-PCR por Nelson, D.L. y col. (1989), "Alu Polymerase Chain Reaction: A method for rapid isolation of human specific sequences from complex DNA sources. *Proceedings National Academy Science* **80**: 1821-1825. y también en LINEs o LI PCR descrita por Miller, J.R. (1994) "Use of porcine interspersed repeat sequences in PCR-mediated genotyping", *Mammalian Genome* **5**: 629-632. Sin embargo, esta técnica no se utiliza para el aislamiento de secuencias repetidas sino para las secuencias contenidas entre ellas.

Tang, J.Q. y col. (1995) "Alu-PCR combined with non-Alu primers reveals multiple polymorphic loci. *Mammalian Genome* **6**: 345-349, realizaron un PCR múltiple utilizando SINE-primers (oligonucleótidos complementarios a las secuencias SINEs) y otro cebador diseñado según la secuencia flanqueante a algún SINE en el extremo 3', lo cual produce la amplificación de distintas regiones. Diferentes parejas de SINE-primers, consistentes en un cebador marcado específico del locus y otro complementario a la región SINE, producen variedad de bandas como resultado de una amplificación múltiple. Parece ser que los cebadores de moderada longitud a menudo pueden unirse a regiones distintas de su locus específico, sin embargo sólo si utilizamos un cebador multiespecífico

(SINE-primer) podemos visualizar esa variedad de bandas. Además, como la zona del extremo 3' de los SINEs es muy polimórfica, estos autores consiguieron amplificar en una única reacción 2 o 3 polimorfismos a la vez. Estos polimorfismos están únicamente relacionados con SINEs.

A la vista de la importancia de las secuencias de ADN descritas, la utilización de métodos que permitan la detección y análisis de estas secuencias se hace sumamente importante, debido a la importancia de completar los distintos mapas genéticos de las distintas especies. De acuerdo con esto en la presente invención describimos un método para la detección de este tipo de secuencias altamente repetidas y que presentan variabilidad en el genoma. Este tipo de secuencias altamente repetidas, poco estudiadas en genomas como el porcino, vacuno y otros, podrán aportar datos a los mapas de la especie y las aplicaciones derivadas de ello. Otra de las aplicaciones de estas secuencias altamente repetidas, dependiendo de su naturaleza, es que pueden ser utilizadas como secuencias específicas de las especies estudiadas, y ser utilizadas como marcadores especie-específico. La técnica descrita en esta invención es un método rápido y eficaz en la búsqueda de este tipo de secuencias del ADN. Este método presenta mayor rapidez y una alta eficacia en relación a los métodos descritos hasta ahora para la localización de secuencias altamente repetidas en el genoma.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método para detectar a partir de una muestra de ADN, mediante una reacción enzimática basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), nuevos marcadores altamente repetidos y polimórficos en el genoma (microsatélites, SINEs, LINEs). Consiste en anillar al azar oligonucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean dichos marcadores de ADN o que la incluyen, y polimerizar enzimáticamente copias de dicha secuencia de ADN. La presente invención incluye la elección de los oligonucleótidos que flanquean dichas secuencias diseñados a partir de tres

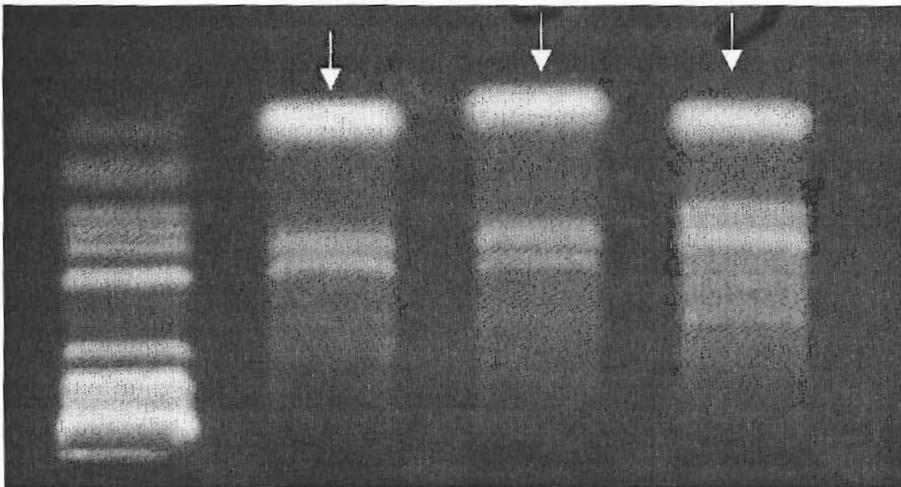
especies distintas a la muestra que se utiliza como sustrato en la reacción en cadena de la polimerasa. La detección del producto resultante de la amplificación enzimática se lleva a cabo por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

Otro aspecto adicional de la presente invención consiste en la extracción del gel de agarosa, tras el corrido electroforético de la banda de ADN que aparece más intensamente teñida tras el corrido electroforético y visualización con bromuro de etidio (Figura 1). Posteriormente, este fragmento de ADN se clonará y secuenciará con el fin de conocer su secuencia. Finalmente dicha secuencia se estudiará y comparará con otras secuencias del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin de buscar los motivos de repetición así como posibles microsatélites.

Está prevista además la realización de una reacción de amplificación con el fin de estudiar la posible variabilidad de los microsatélites detectados en las secuencias aisladas. Para este fin, se procederá a la realización de unas reacciones de amplificación en animales pertenecientes a distintas razas porcinas.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1** muestra la amplificación inespecífica obtenida con esta técnica. Carrera 1 es un marcador de talla (Gibco 1kb), carreras 2, 3 y 4 muestran la amplificación inespecífica obtenida con este método. Las flechas indican la banda más intensamente teñida que posteriormente es extraída del gel de agarosa.



## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

La presente invención proporciona un método, en el cual a partir de una muestra de ADN y mediante la reacción en cadena de la polimerasa se puedan aislar nuevos marcadores altamente repetidos y candidatos a ser polimórficos en el genoma (microsatélites, SINEs, LINEs). Asimismo, la presente invención proporciona una gran cantidad de secuencias de zonas poco estudiadas del genoma y que podrán por lo tanto aportar datos interesantes a los mapas de especie y las aplicaciones derivadas de ellos, destacando la utilización de estas secuencias repetidas de la especie como marcadores de especie-específicos. Los oligonucleótidos que flanquean dichas secuencias han sido sintetizados a partir de secuencias de humana, rata y bovino, realizándose la amplificación en porcino con el propósito de aumentar la inespecificidad en la reacción de amplificación. Los oligonucleótidos utilizados aparecen en la Tabla 1.

**Tabla 1.-** Oligonucleótidos utilizados en la distintas amplificaciones, y especies a partir de los cuales han sido sintetizados:

1.- 5'-CTT CAT GGA CAC AAT GCT GC-3'	Rata
2.-5'- ACT TCT CCA GGA TGG GCA CC-3'	Humana
3.- 5'- ATA CAG ATG GCT TCA AGG AG-3'	Humana
4.- 5'- GCC ATG GGC TTC AAT ATA TT-3'	Rata
5.- 5'- GTC TTG CTT CTT TGT CTA TC-3'	Humana
6.- 5'- AGT TAT CAG AGG CTG GAA AG-3'	Humana
7.- 5'- GCT ATC TTC TTG AAG AAC GT-3'	Rata
8.- 5'- ATC TTC TTG AAG AAC GTG AC-3'	Rata-Humana
9.- 5'- CAT GTA TCG GAA GGC GTC CT-3'	Rata
10.- 5'- ATT TTC TGA CCT TAT GGT GT-3'	Rata

11.- 5'- CAC ACC GTA CCT GGG AGG -3'	Bovino
12.- 5'- TAA GGA GAT GTC AGC TGT G-3'	Humana
13.- 5'- GAC TGG AAT GGA GCA TAA AG-3'	Humana
14.-5'- AGG ACC CCT TCC GAT ACA TG-3'	Vacuno-Rata
15.- 5'- CAG AAG GTG TTG GAG ATG GC-3'	Humana-Rata
16.- 5'- GGA AAG CTG AAG GAT CTG TC-3'	Rata
17.- 5'- CAG TGT TTG TTC CTC GGA GT-3'	Rata
18.- 5'- AAG GCG TCC TCC ACC TGG GC-3'	Rata-Humana
19.- 5'- TGT GAA GGA TGT GGA TGA TGG-3'	Bovino
20.- 5'- TGT GGA CTG GCA CGA AAA TG-3'	Bovino
21.- 5'- CTC TGT CTG CCA GGG TTC TTG-3'	Bovino
22.- 5'- GGT TAA GAC TCC ACA TGT CT-3'	Bovino
23.- 5'- AGG CCT TCG GTT GGC CTA TG-3'	Bovino

Estos cebadores se utilizaron en muestras ADN porcino, obtenido a partir de sangre según el método descrito por Sambrook et al. (1989). "Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Las muestras sanguíneas utilizadas pertenecen a las razas Landrace y Large-White.

La amplificación de las muestras de ADN se realizó en un volumen de 25µl que contenía 25 ng de ADN, 1x de tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM y 0,1 % de Tritón X-100), 3-4 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 0,5µM de cada cebador y 2 unidades de Taq (*Thermoaquaticus* polimerasa) (Promega). La reacción de amplificación fue llevada a cabo mediante un ciclo de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30-35 ciclos de amplificación: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 46-50°C y 1 minuto a 72°C.

Otro aspecto adicional de la presente invención consiste en la extracción del gel de agarosa, mediante la herramienta "Concert Rapid Gel Extraction System" (Life Technologies), tras el corrido electroforético de la banda de ADN que aparece más intensamente teñida y visualización con bromuro de etidio (Figura 1). Esta elección se debe a que previsiblemente dicha banda debe corresponder a zonas altamente repetidas en el genoma. De manera que al existir más cantidad de estos elementos en el genoma, hay una mayor amplificación de los mismos y por lo tanto se visualizan con una tinción más intensa. Tras la extracción, del ADN del gel de agarosa, los diferentes fragmentos de ADN fueron clonados mediante la utilización del plásmido pMos-Blue (Amershan-Pharmacia). Finalmente estos fragmentos fueron secuenciados mediante el método de Sanger y cols,(1977), DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *PNAS*, 74.

Las secuencias obtenidas fueron estudiadas para encontrar motivos de repetición: LINEs, SINEs, MER (Medium reiteration frequency sequences), MIR (Mammalian-wide interspersed repeats), etc. Para este fin se comparó las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin de encontrar homologías con las regiones repetidas descritas en distintas especies. Con el mismo objetivo, se realizó el estudio de los motivos de repetición con el programa RepeatMasker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>). Para cada pareja de cebadores se realizó una amplificación, extracción del gel de agarosa de la banda más intensamente teñida, clonación, secuenciación y estudio de la secuencia. Si tras esta primera amplificación la secuencia no presentaba homología con ninguna secuencia repetida ni microsatélite, se realizaba una segunda amplificación con los mismos cebadores, aumentando la inespecificidad mediante la disminución de la temperatura de hibridación, y aumento del magnesio. Posteriormente la secuencia aislada se comparaba nuevamente con las bases de datos del GenBank, para estudiar los motivos de repetición. Esto se repitió hasta que se encontró un motivo de repetición o microsatélite en todas las combinaciones de oligonucleótidos

realizadas. Las distintas combinaciones de estos cebadores para la amplificación, así como los resultados sobre las zonas repetidas se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.-** Combinaciones de los 23 oligonucleótidos, número de amplificaciones, talla obtenida, número del clon y motivos repetidos de cada una de las secuencias (Microsatélites y secuencias derivadas de transposición: SDT).

Cebadores	Nº Amplificaciones	Talla (p.b.)	NºClon	Motivo repetición
I-2	1	254	Z-116	Microsatélite
5-6	1	120	Z-111*	SDT (MLTCl)
7-9	1	195	Z-134*	SDT (MLT2CB)
7-18	1	159	Z-121	SDT (L2)
10-11	1	449	Z-128	SDT (MER )
16-17	1	171	Z-117	SDT (SINE/Pig)
22-23	1	500	Z-130	SDT (SINE/pig)
20-21	1	217	Z-133	Microsatélite
3-4	2	135	Z-125	-
		+1000	Z-118	Microsatélite.
8-18	2	210	Z-124	-
		172	Z-104	SDT (MIR2)
14-15	2	526	Z-115	-
		183	Z-101	SDT (L2 humana)
		282	Z-120*	SDT (L2)

19-21	2	358	Z-132	-
		217	Z-131*	SDT (SINE/Pig)
12-13	3	158	Z-107	-
		177	Z-127	-
		88	Z-114	SDT (MTL1A2)
7-15	4	158	Z-102	-
		155	Z-108	-
		148	Z-112	-
		205	Z-123*	SDT (MIF)

\* Clones que contienen secuencias derivadas de transposición, y con microsatélites incluidos.

En la **Tabla 2**, se observa que existen 8 combinaciones de cebadores a partir de las cuales se han aislado secuencias derivadas de transposición y/o microsatélites en la primera amplificación realizada. Son 4 las parejas de oligonucleótidos en las que se necesitaron 2 amplificaciones, 2 en las que fueron necesarias 3 y 4 amplificaciones para obtener las regiones de interés.

Un aspecto de la presente invención que se debe destacar, es la alta eficiencia en el aislamiento de las secuencias repetidas en el genoma porcino. De forma que de las secuencias obtenidas, más de un 50% presentaron un motivo de repetición. A esto hay que sumar un 6% de secuencias que a pesar de no presentar estos motivos de repetición si que presentan microsatélites. Con lo cual la eficacia del método para encontrar las regiones que proponemos es de un 56%. Es necesario indicar que estas secuencias que presentan motivos de repetición, que se encontraron en los clones Z-111, Z-120, Z-123, Z-131 y Z-134, mostraban secuencias microsatélites que pueden ser utilizadas para estudios de variabilidad.

Otro aspecto interesante que cabe resaltar de los resultados obtenidos es que de las secuencias observadas (repetidas o no) sólo 3 de las 19 secuencias estaban ya descritas en la base de datos. De esta forma se aportaron 16 nuevas secuencias, no estudiadas en el genoma porcino. Otro aspecto adicional de la presente invención es el aislamiento de fragmentos especie-específico. Los clones Z-117, Z-128 y Z-130 que presentaron alta homología con gran número de intrones de genes de la especie porcina, en particular con el ppK98 en el caso de los dos últimos clones. Esto prueba que la técnica descrita, puede ser utilizada para localizar secuencias específicas de secuencias repetidas de la especie porcina y que posteriormente podrán ser utilizadas como marcadores de especie-específico aplicables a la detección de células porcinas en distintos tejidos animales. Así, el 94% de las secuencias obtenidas no están descritas en la base de datos lo que supone una gran fuente de secuencias de zonas poco estudiadas del genoma porcino y que podrán por lo tanto aportar datos interesantes a los mapas de especie y las aplicaciones derivadas de ellos. Las secuencias obtenidas se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Secuencias obtenidas que presentaron una secuencia derivada de transposición y/o microsatélite. En **negrita** aparece la posible secuencia microsatélite.

**Z-101.**

5'CAGAAGGTGTTGGAGATGGCACTGTCTGGGGGTTATGGCGACGGCC  
ATGGGGAGAACAGTGTGGGGGTTGGGTCGTGACATTCAGGTTGAGAA  
TCGTAACGATGTTTGTGAATTAGTGTTTGATGGAGACAGTGATGGCAT  
CTGATAGAGCCTCCTTGCAGGAAGCCGAGAAACCAGACCGTG 3'

**Z-104.**

5'TTAAGGAGATGTCAGCTGTGGAGATCCCGCTTCTTGATTCACTGAGC  
TTTACTCCCTCCTGCTTCACACATACCTCCTGGACCAGGAGCTCCACAT  
TCATCAAACACTATTTTGTCTATAAGTTTATCTCATGCCTTTGGGGAGC  
CTGGTCTTATATATGCATCTCGTGTAC3'

**Z-111.**

5'TCTTGCTTCTTTGTCTATCTCTGTGTGCTTCCTCCTACAAGAATAGG  
AGAGGAATGTCAAGGTGAAATCACATCCGTTGGTTGGTTTCATCCTGA  
TGTTTCGTACCTAATGACATCTGCAAAGACCCTCT-3'

**Z-114.**

5'GAAGGCAGCCATTGGCAAGCCAACAAAGTGGTCTCTTAGAGAACCT  
CACCCATTCCCTGACCCCTATTTTAGCTTAAGCCTCTAGAATT3'

**Z-116.**

5'TGGGTTACATCGAACTGGATCTAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGT  
TTTCGCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC  
TATGTGGCCCGGTATTATCCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTC  
GGTCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT  
CACAGAAAAGCATCTTACGGATTGGCATGACAGTAAGAGAATTGATG  
CAGTCGTCGTGCCGATAA 3'

**Z-117.**

5'TTAAGGATCCGGCATTGCCGTTAGCTGTGGTGAAGGCTGTAGACGCG  
GCTCGGATCCTGTGTTGCTGTGGCTCTGGCCTAGGCTGGCGGCTACAG  
CTCCGATTCGACCCTAGCCTGGGAACCTCCATATGCCATGGGAGTGGC  
CCAAGAAATGGCAAAAAAAGACAAAAAAG-3'

**Z-118.**

5'GAAATGATATCTAAACTGAGATCTGGAGGATGAGTAAGAATTTGAA  
AAGGAGAAAGAGAAGTTGGTGACCATGGACCAAAGTAATTAGAAAGA  
ACCAACAACAACAACAAAAACAAGGAATCAAGAGGCAACAAGGG  
CACCCCGGAGAACTGAAACAAATCCAGGAAGATTGAAATGTAGAAT  
CGATGAAAAGTCTAGAAAATAGGCAAGGACCAGAGCCTGCACATATT  
GGAGCTGTTAGAAGGCTGATTTATCTTAGACATAGGATCTA 3'

**Z-120.**

5'AGGACGCCTTCCGATACATGAAGAAATAGATTAGGAGGCCATTAGG  
TGGAAGAAAATGGTATTATATTTGCCCTTGACTAGTTAATGGTGTTTAA  
CTGCTGTGCTGTTGCTCTGGGCCAGAGGTTAAACATGGCCCACTCGA  
GGTTCTGTGCCACCGTCTGACCTCACCGTCCACCGTTTCCTCTCAATCC  
AGCTCCATGCCAGGGCCTTTGCACTGGAGGCTCCCTCTGCTGAAAAC  
CCACTCCCTCACTAGTGTGCACTGCCATCTCCAACACCTTCTG 3'

**Z-121.**

5'AGCTTCTTGAAGAACGTGACTTGGGAGAGTGAGGAAGGAGGCGGCA  
TGGGGTTTCTGTGGAGCTTGTGGGGTGCAATGGGGTGAGGGTTTGAAC  
ATTCTGCTAGTTCCAAGGGCTTTCTCATCAGCCTGGCCCAGGTGGAGG  
ACCCCTTATCGGATCCC-3'

**Z-123.**

5'CATCTCCAAGACCTTCTGTGTTAATTATCTTTTGCTGTGTACCCTAAA  
CGACAGAGATTTAAAACAACAACATTCATTACCTTACTGTTTGTGTG  
AATCGGGACTCCAGACGCGTTTTAGCTAGGTGGCTTTGGCTGACCGGA  
T 3'

**Z-128.**

5'ACTCAGAGACCTCTCTGCTTCACAAAGCTTATAGTTTACTACGACTTG  
CCAGGAAGCTAGACAGTACATGACAACACAGCCTAGTGAGGGGCCCA  
GTCTCTGGTCTTGGAGCATATTTATTAGTGATCCAGGTTGGTGGAGAGT  
TGA CTCAGTTTCGGATGCAA ACTGAAGCTGACCGTTAGACGTCTTAGA  
GATTTAAAAGGCAGTTGGACATAGGAGCACAGAGCCAGCACAGAGAT  
AGTCTAGACCAGGAGGCTGGCACCCATGAGGAATTTTATCAGGACACG  
GGCTCATCATGTCTTGTCTATGGCTGCTGTCAAGCTAGAAGAGTCCTAT  
AGGCCAGAAGCTTAAAGTATTTACTAGCTGACCCTTTAAGTTTGCTGA  
CTCCTGATCTAGACTAAGAATATAAAGGACCCTGAGAAGGATCTGGAA  
CTTGAGTCCATGACAGT-3'

**Z-130.**

5'GGTTAAGACTCCACATGTCTAATTTTGTAAAGAACTGCCAAAATGAA  
TCGAAGTTCCTGTTGTGGCTCAGGGGGTAGACCCA ACTAGTGTCCTGA  
GGATTCGGATTTTGACTCCGCCTTCACTCAGTGAGTTAAGGATCCGCAT  
TAACCGCCAACGCTATTGTGTAGGTCACCAGAGGCCAGCCTTCGGACC  
TGGCCATTGCTAAGGCTATCGGCATAGGCCAACCGAAGGCCT-3'

**Z-131.**

5'GGACCAGGGTCTGAACCAGTGCCCAAGCAGCTACCCAAGCTGCTGC  
AGTGACAACACTGGATCCTTTACCTGCTGTGCCAGAAGAGA ACTCCAT  
TTGGAAACCTTTTTTTGAATTT CATATATATCCCAACAGCCTACATGAT  
ATTTCTGCACAGATGTCCAATAAGCATCCTTTGGGAAACTTAACACAG  
TCAACATGAACTCTCCATTGTCTCCTCCC-3'

**Z-133.**

5'GGTTCTTGGTTCTGAACTCAAAAGTTTGACAAAGGAATAAGAAACCN  
GCCTCACATCAGTCTTAACATTGAAGTACCTTTTGAAAAATTACATAG  
ATACACACACACACTTTAAAGTTAGAAAAACATAGGAAATAATA  
AAAATAATATAACACTTATGTACTCATCANNNACCTTTGTCAAATCTT  
AATGTTTTCCCACAATTTATTCCTTTTTTTTTGGGCAGAAAACTTTAGA  
AATACCACTGAAGTTCCTTATGTACCTATCTTCGAATCTACTTTCTTCA  
TATCTCCGTCTGAAAGAAATCTTTTCCCCTATTTTTTTTAT-3'

**Z-134.**

5'GGATGGGCACCCGGTGGCCTCGTCAAGTCAACACATAAAATTTACCA  
GCATGTTCCCTAACCAATGATACTGACATTAAGGAAGATAACTGGAGA  
TACTCGCCACATATACCCCATTGCTCTCTGAGAGGCAGAATAACTGGT  
TGCGTCATTATATTTGTAAGTCTAGAGCTTGCCTGGTCATAGGTTTTTG  
CCC-3'

Para estudiar la posible variabilidad los microsatélites, en 30 muestras de la especie porcina se realizó la extracción de ADN a partir de sangre mediante el método descrito por Sambrook et al. (1989). "Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los animales a partir de los cuales se extrajo el ADN pertenecían a las razas, 5 a Landrace, 5 large-White, 5 Duroc, 5 Pietrain, 5 Chatos Murcianos y 5 Ibéricos.

La amplificación de los microsatélites se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l que contenía 25 ng de ADN, 1x de tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM y 0,1 % de Tritón X-100), 2 mM de  $Cl_2Mg$ , 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP y dCTP, [ $\alpha^{32}P$ ]dCTP (3000Ci/mMol), 0,5 $\mu$ M de cada cebador y 2 unidades de Taq (*Thermoaquaticus* polimerasa) (Promega). La reacción de amplificación fue llevada a cabo mediante un ciclo de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30

ciclos de amplificación: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C.

La visualización del fragmento amplificado se llevó a cabo mediante electroforesis en geles acrilamida y posterior exposición autoradiografía.

Los microsátélites encontrados en los clones Z-116, Z-118, Z-120 y Z-133 fueron testados en los 30 animales. Así, para el clon Z-116 se observó que era monomórfico, mientras que en los restantes se detectó variabilidad. En el clon 120 se detectaron 2 alelos, encontrándose 3 alelos para los clones Z-133 y Z-118. Asimismo, se testaron los microsátélites en 2 familias de la raza Chato Murciano comprobándose la existencia de herencia mendeliana codominante en los mismos.

## REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para detectar, mediante una amplificación enzimática basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una secuencia de ADN mediante cebadores inespecíficos, que comprende anillar oligonucleótidos al azar en secuencias repetidas del genoma, y polimerizar enzimáticamente copias de dicha secuencia de ADN, para obtener amplificaciones inespecíficas.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, para la elección de los oligonucleótidos que flanquean dichas secuencias diseñados a partir de especies distintas a la muestra que se utiliza como sustrato en la reacción en cadena de la polimerasa.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección del producto resultante de la amplificación enzimática se lleva a cabo por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1 y 2 en el que se extrae el fragmento de DNA que se ha teñido más intensamente y posterior secuenciación del mismo.

5.- Procedimiento en el que las secuencias obtenidas mediante la aplicación de las reivindicaciones 1, 2 y 3 son estudiadas para localizar los motivos de repetición que poseen con la finalidad de buscar:

- a) Motivos de repetición no descritos en la especie estudiada.
- b) Secuencias no estudiadas en el genoma analizado para el estudio de su posible variabilidad.
- c) Secuencias específicas de especie.

6.- Un procedimiento para analizar las secuencias obtenidas según las reivindicaciones 1, 2 y 3, que comprende:

- a) Selección de los clones con el fin de estudiar el polimorfismo existente en las mismas.
- b) Amplificar enzimáticamente en ADN de varios individuos de la especie porcina, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) marcado radioactivamente un fragmento de DNA que contendrá el polimorfismo encontrado.
- c) Detección del polimorfismo mediante visualización en electroforesis y posterior autoradiografía.

## RESUMEN

### I.R.A.R.S. (INTENSIVE RANDOM AMPLIFICATION OF REPETITIVE SEQUENCES)

La presente invención se refiere al descubrimiento de un método de búsqueda de marcadores de DNA altamente repetidos en el genoma que se encuentran en su mayoría asociados a microsatélites o zonas variables, que se ha denominado I.R.A.R.S. (intensive random amplification of repetitive sequences). Consiste en la unión de cebadores al azar en el genoma, para conseguir una amplificación inespecífica. Tras la observación del corrido electroforético, la banda más intensamente teñida, es extraída, clonada y posteriormente secuenciada.

**Anexo 1: Método de búsqueda de marcadores de ADN altamente repetidos en el genoma mediante amplificación al azar.** "GenBank reports" de las secuencias aisladas que presentan motivos de repetición. Los "Genbank report" de los tres microsatélites polimórficos (Z-118, Z-120 y Z-133) se encuentran en el anexo 2. Z-117 aparece en el anexo 3.

### Secuencia Z-101. GenBank report.

```

LOCUS       AF304151      183 bp      DNA           MAM           09-SEP-2000
DEFINITION  L2 porcine repeat region.
ACCESSION  AF304151
KEYWORDS    .
SOURCE      pig.
  ORGANISM  Sus scrofa
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
            Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;
            Suina; Suidae; Sus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 183)
  AUTHORS   Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.
  TITLE     Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 183)
  AUTHORS   Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica
            Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de
            Zaragoza., Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain
FEATURES             Location/Qualifiers
   source             1..183
                     /organism="Sus scrofa"
                     /db_xref="taxon:9823"
BASE COUNT           43 a           28 c           68 g           44 t
ORIGIN
   1 cagaaggtgt tggagatggc actgtctggg ggttatggcg acggccatgg
   ggagaacagt
   61 gtggggggtg ggtcgtgaca ttcaggttga gaatcgtaac gatgtttgtg
   aattagtgtt
   121 tgatggagac agtgatggca tctgatagag cctccttgca ggaagccgag
   aaaccagacc
   181 gtg//

```

**Secuencia Z-104. GenBank report.**


---

LOCUS AF304152 172 bp DNA MAM 09-SEP-2000  
 DEFINITION MIR2 porcine repeat region.  
 ACCESSION AF304152  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 172)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 172)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
 Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..172  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 BASE COUNT 37 a 47 c 32 g 56 t  
 ORIGIN  
 1 ttaaggagat gtcagctgtg gagatccgc ttcttgattc actgagcttt  
 actccctct  
 61 gcttcacaca tacctcctgg accaggagct ccacattcat caaacactat  
 ttgtctata  
 121 agtttatctc atgcctttgg ggagcctggt cttatatatg catctcgtgt ac//

**Secuencia Z-111. GenBank report.**


---

LOCUS AF304153 129 bp DNA MAM 09-SEP-2000  
 DEFINITION MLTC porcine repeat region.  
 ACCESSION AF304153  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 129)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 129)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica

Bioquímica, Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, zaragoza 50013, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..129  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"

BASE COUNT 29 a 30 c 26 g 44 t

ORIGIN  
 1 tcttgtttct ttgtctatct ctgtgtgctt cctcctacaa gaataggaga  
 ggaatgtcaa  
 61 ggtgaaatca catcggttgg ttggtttcat cctgatgttc gtacctaag  
 acatctgcaa  
 121 agaccctct//

### Secuencia Z-121. GenBank report.

---

LOCUS AF304154 159 bp DNA MAM 09-SEP-2000

DEFINITION L2 porcine repeat region.

ACCESSION AF304154

KEYWORDS .

SOURCE pig.

ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 159)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and zaragoza, P.  
 TITLE Intensive Random Amplification of Repetitive Elements  
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 159)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genética  
 Bioquímica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
 Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..159  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"

BASE COUNT 30 a 31 c 58 g 40 t

ORIGIN  
 1 agcttcttga agaacgtgac ttgggagagt gaggaaggag gcggcatggg  
 gtttctgtgg  
 61 agcttgtggg gtgcaatggg gtgaggggtt gaacattctg ctagttccaa  
 gggctttctc  
 121 atcagcctgg cccaggtgga ggaccctta tcggatccc//

**Secuencia Z-114. GenBank report.**


---

LOCUS AF304155 88 bp DNA MAM 09-SEP-2000  
 DEFINITION MLT1A2 porcine repeat region.  
 ACCESSION AF304155  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 88)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Intensive Random Amplification of Repetitive Elements  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 88)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
 Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..88  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 BASE COUNT 25 a 25 c 16 g 22 t  
 ORIGIN  
 1 gaaggcagcc attggcaagc caacaaagtg gtctcttaga gacctcacc  
 cattctcgac  
 61 ccctatttta gcttaagcct ctagaatt//

**Secuencia Z-123. GenBank report.**


---

LOCUS AF304156 145 bp DNA MAM 09-SEP-2000  
 DEFINITION MIF porcine repeat region.  
 ACCESSION AF304156  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 145)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Intensive Random Amplification of Repetitive Elements  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 145)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica  
Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..145  
/organism="Sus scrofa"  
/db\_xref="taxon:9823"

BASE COUNT 37 a 32 c 29 g 47 t

ORIGIN  
1 catctccaag accttctgtg ttaattatct tttgctgtgt acctaaacg  
acagagattt  
61 aaaacaacaa acattcatta ccttactgtt tgtgtgaatc gggactccag  
acgcgtttta  
121 gctaggtggc tttggctgac cggat//

### Secuencia Z-131. GenBank report.

---

LOCUS AF304157 217 bp DNA MAM 09-SEP-2000

DEFINITION SINE porcine repeat region.

ACCESSION AF304157

KEYWORDS .

SOURCE pig.

ORGANISM Sus scrofa  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
Suina; Suidae; Sus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 217)  
AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
TITLE Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences  
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 217)  
AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica  
Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..217  
/organism="Sus scrofa"  
/db\_xref="taxon:9823"

BASE COUNT 62 a 61 c 38 g 56 t

ORIGIN  
1 ggaccagggt ctgaaccagt gcccaagcag ctaccaagc tgctgcagtg  
acaacactgg  
61 atcctttacc tgctgtgcca gaagagaact ccatttggaa accttttttg  
aatttcatat  
121 atatcccaac agcctacatg atatttctgc acagatgtcc aataagcatc  
ctttgggaaa

181 cttaacacag tcaacatgaa ctctccattg tctccc//

### Secuencia Z-134. GenBank report.

LOCUS AF304158 195 bp DNA MAM 09-SEP-2000  
 DEFINITION MLT2CB porcine repeat region.  
 ACCESSION AF304158  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 195)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Intensive Rando Amplification of Repetitive sequences  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 195)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (09-SEP-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
 Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50013, Spain  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..195  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 BASE COUNT 54 a 46 c 42 g 53 t  
 ORIGIN  
 1 ggatgggcac cgggtggcct cgtcaagtca acacataaaa ttaccagca  
 tgttccctaa  
 61 ccaatgatac tgacattaag gaagataact ggagatactc gccacatata  
 ccccattgct  
 121 ctctgagagg cagaataact ggttgcgtca ttatatttgt aagtctagag  
 cttgctggt  
 181 cataggtttt tgccc//



REPUBLICA DE ARAT  
1901



Gen

LACOSTE

**MANUSCRITO 2: ISOLATION, MAPPING AND CHARACTERIZATION OF THREE PORCINE MICROSATELLITES (ARTÍCULO 1).**





*Laboratorio de Genética  
Bioquímica  
Facultad de Veterinaria.  
Universidad de Zaragoza*

The Editor  
Bioquímica  
Animal Genetics  
Roslin Institute  
Edinburgh  
Scotland  
UK

Laboratorio de Genética  
Facultad de Veterinaria  
Miguel Servet 177  
50013 Zaragoza  
Spain

August 17th, 2000

Dear Sir,

I send to you the Molecular note "Isolation, mapping and characterization of three new porcine microsatellites" to publish in in Animal Genetics.

I hope this manuscripts is in agreement with your editorial policies.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jorge H. Calvo'.

Jorge H. Calvo (email [jhcalvo@posta.unizar.es](mailto:jhcalvo@posta.unizar.es))

ARAG  
MEXICO  
TACAP

**Isolation, Mapping and Characterization of Three Porcine Microsatellites**J.H. Calvo<sup>1</sup>, R. Osta<sup>1</sup>, A. Robic<sup>2</sup>, A.L. Archibald<sup>3</sup>, P. Zaragoza<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. C/Miguel servet 177. 50013 Zaragoza. Spain

2 Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA-CRT, Castanet-Tolosan 31326, France

3 Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian, Scotland, UK

*Description:* The microsatellites were isolated at random from pig genomic DNA by I.R.A.R.S (Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences)<sup>1</sup>. The DNA fragments isolated were cloned (pMosBlue, Amersham-Pharmacia) and sequenced. The sequences were compared to the EMBL and Genbank databases using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to detect putative homologous regions<sup>2</sup>. The full sequences have been submitted to the EMBL database and their accession numbers are given in table 1.

Primers were designed with the assistance of the software Primer 3v0.2b ([http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)).

*PCR conditions:* The loci were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) in a final volume of 25µl, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP,

dTTP, dGTP and 0.1 mM dCTP, 5 pmol of each primer, 30 ng of template DNA and 2U of *Taq* polymerase (Promega) supplemented with 0.1 mM of ( $\alpha^{32}$ -P)dCTP. The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Thirty cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 50°C for S0615 and S0616 and 52°C for S0614 for 30 s, and primer extension at 72°C for 30s. The last extension step was 5 minutes longer. An initial denaturation at 94°C for 4 minutes was performed to improve the final result. PCR products were fractionated electrophoretically on polyacrylamida gels.

*Polymorphism/segregation analysis:* Codominant segregation was observed in five families (2 Chato Murciano breed, 1 LandracexLarge White, 2 Pietraisx(Landrace-Large White)). S0616 was polymorphic in the five families studied, S0614 was polymorphic in three families (LandracexLarge White, 2 Pietraisx(Landrace-Large White)) and S0615 was monomorphic in all families. The size and frecuencies of alleles observed in a panel of 60 unrelated animals belonging to three breeds are presented in table 2. Polymorphic information content (PIC) was calculated according to Botstein et al. (1980)<sup>3</sup>.

*Chromosomal location/linkage:* Porcine microsatellites S0614, S0615 and S0616 were assigned to chromosome 8(1/2)p21-p23, 1q23-q27 and 1q18 or 1q28-q213 respectively by PCR screening of a porcine rodent somatic

cell hybrid panel<sup>4</sup>. Two point linkage analysis of the S0614 and S0616 polymorphism in the PiGMaP families confirmed these locations on SSC8 and SSC1 respectively (Table 3)<sup>5</sup>. S0615 was monomorphic in the PiGMaP families.

*Acknowledgement:* Research supported by project UZ210-47. J.H. Calvo was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97).

### References

- 1 Calvo J.H. *et al.* (2000) Intensive Random Amplification of Repetitive Sequences. *Spanish patent*. P200000838.
- 2 Botstein D. *et al.* (1980) *American J Human Genet* **32**, 314-331.
- 3 Zhang J. and Madden T.L. (1997) *Genome Res* **7**, 649-656.
- 4 Yerle M. *et al.* (1996) *Cytogenet Cell Genet* **73**, 194-202.
- 5 Archibald A.L. *et al.* (1995) *Mamm Genome* **5**, 157-175.

Correspondence: J.H. Calvo (e-mail: [jhcalvo@posta.unizar.es](mailto:jhcalvo@posta.unizar.es)).

Table 1. Primer sequences, repeat array of S0614-S0616 pig microsatellites.

Locus name	GenBank Acc. Num.	Repeat array	Primer sequences
S0614	AF279700	GAAC(CAA) <sub>5</sub> (A) <sub>5</sub> CAA	GTTGGTGACCATGGACCAAAG CAATATGTGGCAGGCTCTGGTC
S0615	AF279701	CTGCTGTGCTGTTGCTC T	GATTAGGAGGCCATTAGGTG CGAGTGGGCCATGTTTAACC
S0616	AF279702	(CA) <sub>6</sub> C(T) <sub>3</sub> (A) <sub>3</sub>	CTCACATCAGTCTTAACATTG ATAGGTACATAAGGAACTTC

Table 2. Characterization of microsatellites S0614-S0616.

Locus Breed	Nº of alleles	Size range	Heterozygosity	PIC
S0614				
Pietrain	1	176	0.000	0
Large White	3	174-178	0.580	0.67
Landrace	3	174-178	0.489	0.45
S0615				
Pietrain	2	114-116	0.180	0.16
Large White	1	114	0.000	0
Landrace	1	114	0.000	0
S0616				
Pietrain	2	220-224	0.495	0.38
Large White	3	220-226	0.515	0.54
Landrace	3	220-226	0.596	0.43

Table 3. Two point linkage results of S0614 and S0616 with closely linked loci.

Loci	$\theta$ (cM)	maximun lod score
S0614-ALB1	14	4.37
S0614-CASAS1	10	5.21
S0614-CASAS2	14	4.37
S0614-FGA	12	4.72
S0614-FGB	10	6.39
S0614-FGG1	10	5.43
S0614-S0017	12	7.04
S0614-S0069	5	7.76
S0614-S0086	11	6.68
S0614-S0225	21	3.58
S0616-S0020	13	3.94
S0616-S0079	10	4.58
S0616-S0082	16	3.84
S0616-S0113	13	3.45
S0616-S0142	9	4.27
S0616-S0155	11	5.17
S0616-S0302	14	4.02
S0616-S0311	12	4.67
S0616-S0313	14	3.90

## Anexo 2: Isolation, mapping and characterization of three porcine microsatellites.

### Secuencia s0614. GenBank report.



1 : GI = "9887222" [GenBank]

Sus scrofa microsatellite s...

Taxon

---

LOCUS AF279700 274 bp DNA MAM 24-AUG-2000  
DEFINITION Sus scrofa microsatellite sZ001 sequence.  
ACCESSION AF279700  
VERSION AF279700.1 GI:9887222  
KEYWORDS .  
SOURCE pig.  
ORGANISM Sus scrofa  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
Suina; Suidae; Sus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 274)  
AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
TITLE Isolation and characterization of three new porcine  
microsatellites  
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 274)  
AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (19-JUN-2000) Laboratorio de Genetica  
Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
Zaragoza, c/Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
Source 1..274  
/organism="Sus scrofa"  
/db\_xref="taxon:9823"  
/chromosome="8"  
/map="8p23-p21"  
repeat region 1..274  
/note="microsatellite sZ001"  
/rpt\_type=tandem

BASE COUNT 120 a 40 c 66 g 48 t  
ORIGIN  
1 gaaatgatat ctaaactgag atctggagga tgagtaagaa tttgaaaagg  
agaaaagagaa  
61 gttggtgacc atggaccaa gtaattagaa agaaccaaca acaacaacaa  
aaaaacaagg  
121 aatcaagagg caacaagggc acccggaga aactgaaaca aatccaggaa  
gattgaaatg  
181 tagaatcgat gaaaagtcta gaaaataggc aaggaccaga gcttgcacat  
attggagctg  
241 ttagaaggct gatttatctt agacatagga tcta//

---

## Secuencia s0615. GenBank report.

 1 : GI = "9887223" [GenBank] Sus scrofa microsatellite s...

---

LOCUS AF279701 282 bp DNA MAM 24-AUG-2000  
 DEFINITION Sus scrofa microsatellite sZ002 sequence.  
 ACCESSION AF279701  
 VERSION AF279701.1 GI:9887223  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 282)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Isolation and characterization of three new porcine  
 microsatellites  
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 282)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (19-JUN-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
 Zaragoza, c/Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain

FEATURES Location/Qualifiers  
 Source 1..282  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 /chromosome="1"  
 /map="1q23-q27"  
repeat region 1..282  
 /note="microsatellite sZ002"  
 /rpt\_type=tandem

BASE COUNT 62 a 82 c 63 g 75 t  
 ORIGIN  
 1 aggacgcctt ccgatacatg aagaaataga ttaggaggcc attaggtgga  
 agaaaatggt  
 61 attatatattg cccttgacta gttaatggtg ttaactgct gtgctggtgc  
 tctgggccag  
 121 aggttaaaca tggcccactc gaggttctgt gccaccgtct gacctcacg  
 tccaccgttt  
 181 cctctcaatc cagctccatg ccagggcct ttgcactgga ggctccctct  
 gctgaaaacc  
 241 cactccctca ctagtgtcga ctgccatctc caacaccttc tg//

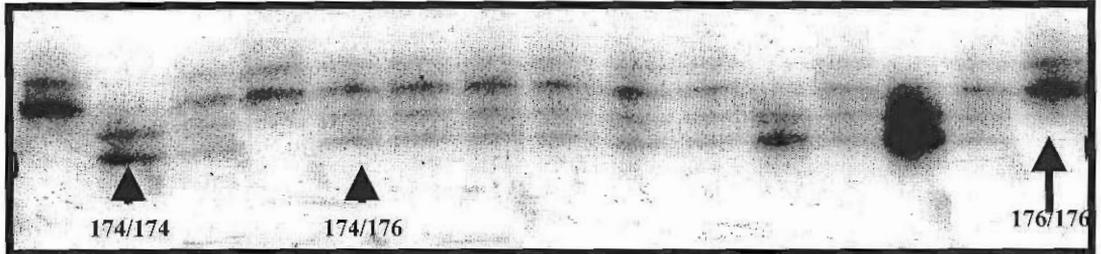
---

## Secuencia s0616. GenBank report.

1 : GI = "9887224" [GenBank] Sus scrofa microsatellite s...

LOCUS AF279702 328 bp DNA MAM 24-AUG-2000  
 DEFINITION Sus scrofa microsatellite sZ003 sequence.  
 ACCESSION AF279702  
 VERSION AF279702.1 GI:9887224  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 328)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Isolation and characterization of three new porcine  
 microsatellites  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 328)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (19-JUN-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimica, Facultad de Veterinaria. Universidad de  
 Zaragoza, c/Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..328  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 /chromosome="1"  
 /map="1q18"  
repeat\_region 1..328  
 /note="microsatellite sZ003"  
 /rpt\_type=tandem  
 BASE COUNT 113 a 64 c 35 g 112 t 4 others  
 ORIGIN  
 1 ggttcttggt tctgaactca aaagtttgac aaaggaataa gaaacngcc  
 tcacatcagt  
 61 cttaacattg aagtaccttt tgaaaaatta catagatata cacacacaca  
 cttaaagtt  
 121 agaaaacat aggaaataat aaaaataata taacattat gtactcatca  
 nnnacctttg  
 181 tcaaatctta atgttttccc acaatttatt cttttttttt gggcagaaaa  
 acttttagaaa  
 241 taccactgaa gttccttatg tacctatctt cgaatctact ttcttcatat  
 ctccgtctga  
 301 aagaaatctt ttcccctatt ttttttat//

**Figura 12.** Autoradiografía del microsatélite s0614, en la que se indica con flechas los genotipos 174/174, 174/176 y 176/176.



**Figura 13.** Autoradiografía del microsatélite s0615, en la que se indica los genotipos 114/114 y 114/116.



**Figura 14.** Autoradiografía del microsatélite s0616, en la que se indica con flechas los genotipos 220/222 y 220/226.

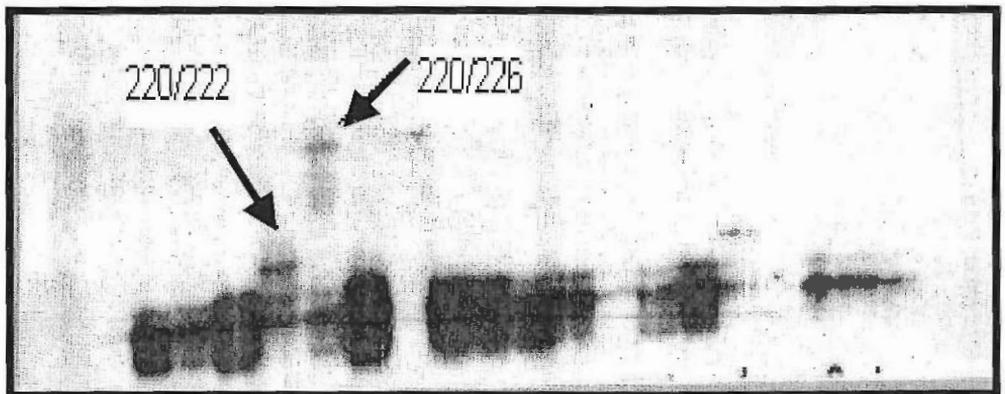
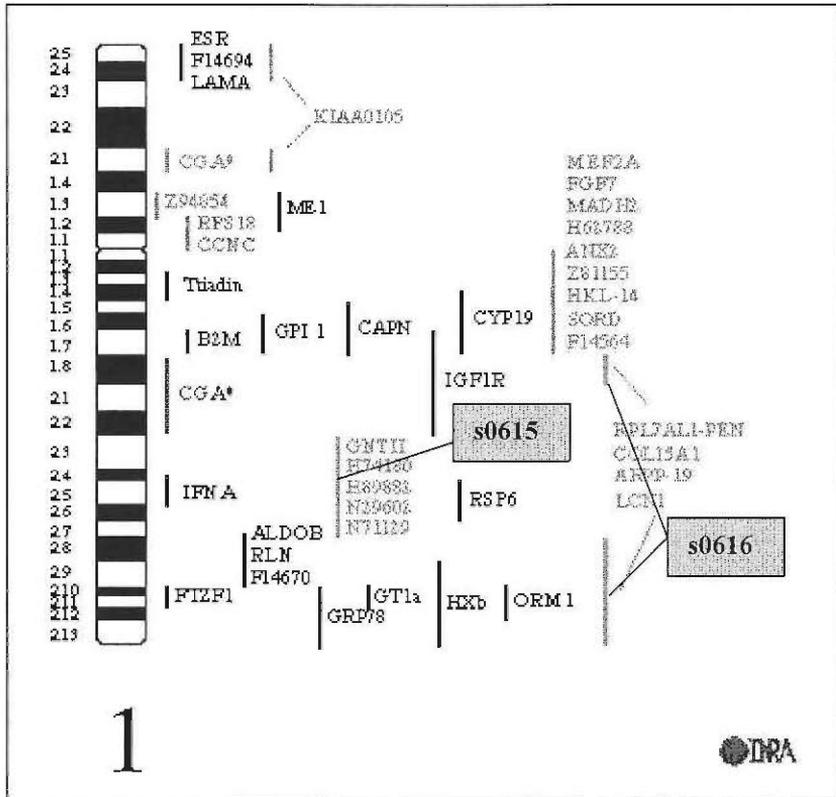


Figura 15. Situación actual del cromosoma porcino SSC1.



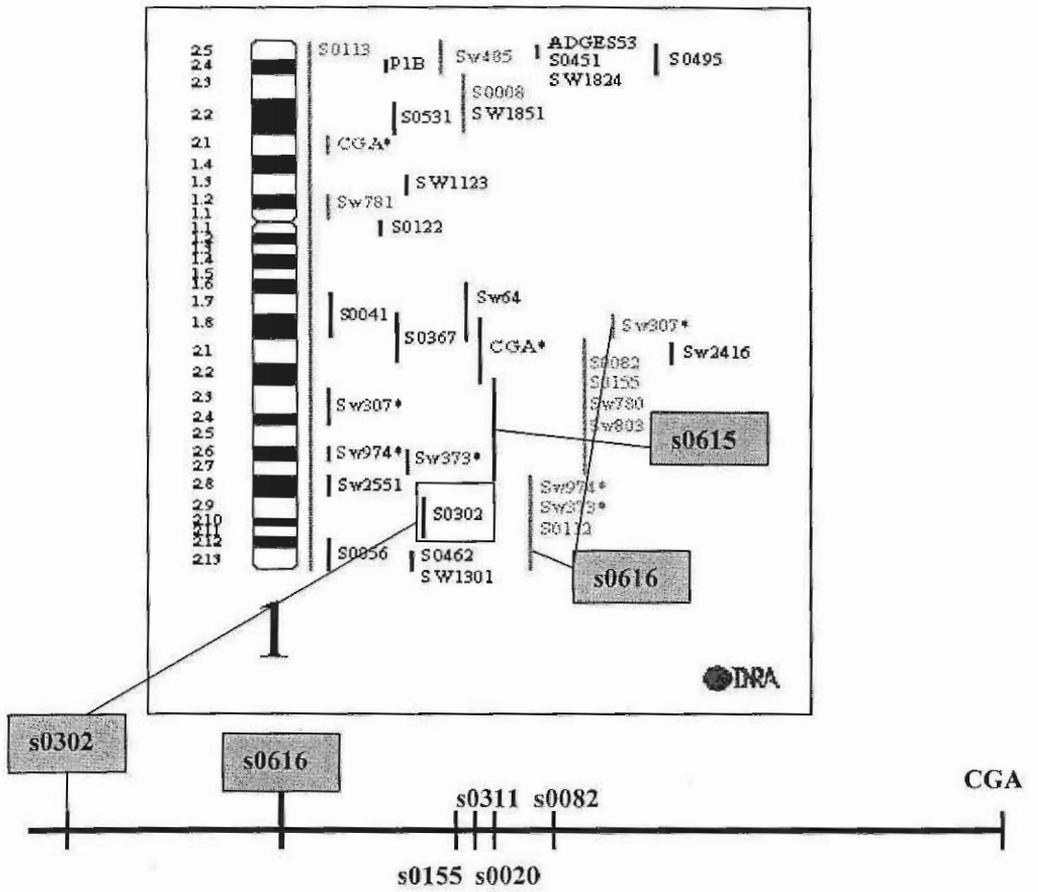
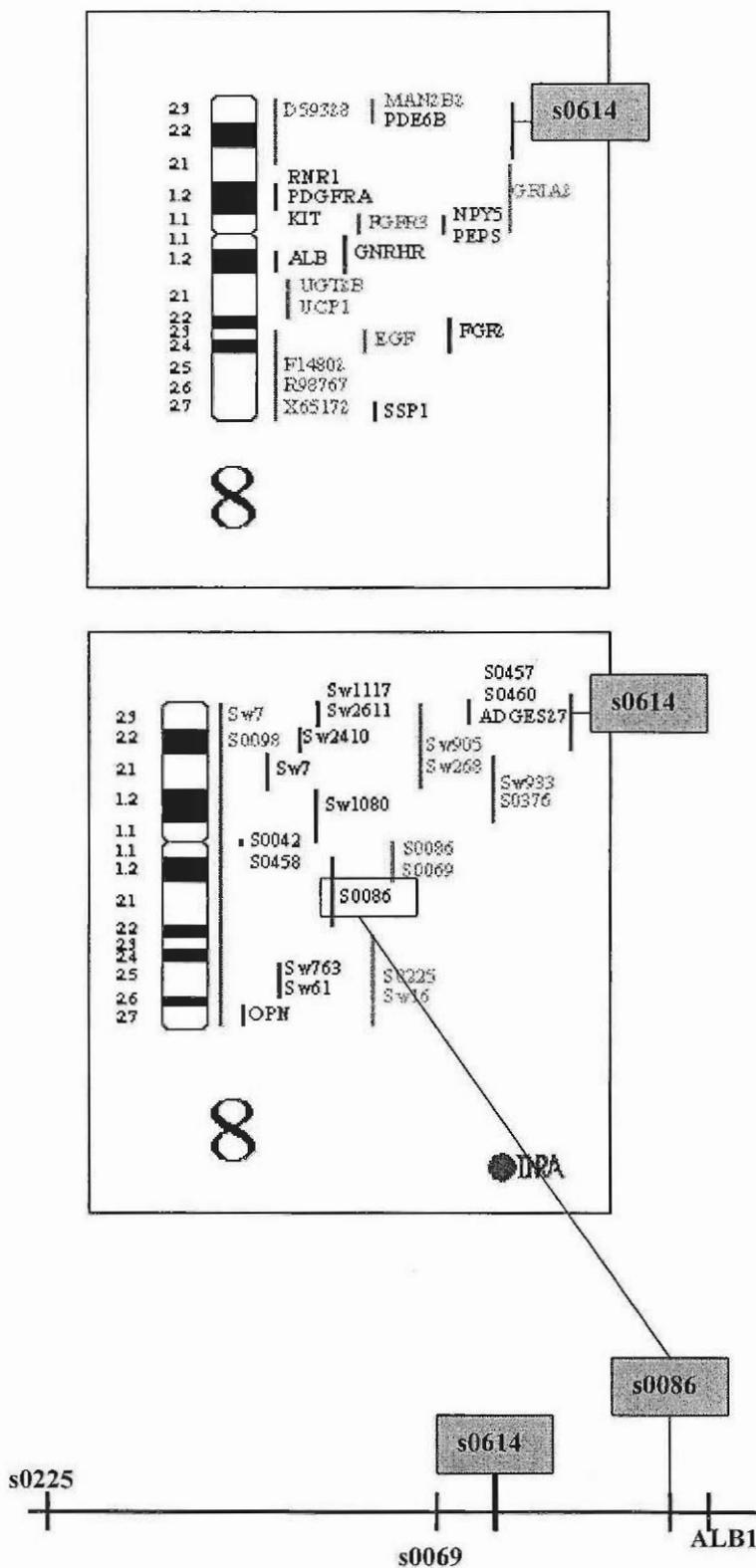


Figura 16. Situación actual del cromosoma porcino SSC8.



**MANUSCRITO 3: Región de ADN específica de la especie porcina y procedimiento de detección de la misma en productos alimenticios (P9902520 Patente 2)**

ARAG



UTAC


**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y  
MARCAS**
**INSTANCIA DE SOLICITUD DE:**
 PATENTE DE INVENCION     MODELO DE UTILIDAD

(1)		(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN		NUMERO DE SOLICITUD	
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA		MODALIDAD ..... NUMERO SOLICITUD ..... FECHA SOLICITUD .....		FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.	
		MODALIDAD ..... NUMERO SOLICITUD ..... FECHA SOLICITUD .....		FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.	
				(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO	
				ZARAGOZA	
(4) SOLICITANTE(S)		APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA		NOMBRE	
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, y en su nombre y representación D. Juan José Badiola Díez, Rector de dicha Universidad				DNI	
				30.040.626	
(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE					
DOMICILIO Ciudad Universitaria, Plaza San Francisco, s/n					
LOCALIDAD ZARAGOZA					
PROVINCIA ZARAGOZA					
PAIS RESIDENCIA ESPAÑA					
NACIONALIDAD ESPAÑA					
TELEFONO 976-56.50.03					
CODIGO POSTAL 501015					
CODIGO PAIS					
CODIGO NACION					
(6) INVENTOR(ES)		(7)		(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO	
		<input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR		<input checked="" type="checkbox"/> INVENC LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD	
OSTA PINZOLAS, ROSARIO		ROSARIO		Española	
CALVO LACOSTA,		JORGE		Española	
RODELLAR BENELLA,		CLEMENTINA		Española	
ZARAGOZA BADIOLA,		ISAIAS		Española	
ZARAGOZA BERNANDEZ,		PYLAR		Española	
(9) TITULO DE LA INVENCION					
REGION DE ADN ESPECIFICA DE LA ESPECIE PORCINA Y PROCEDIMIENTO DE DETECCION DE LA MISMA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS.					
(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P. <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					
(11) EXPOSICIONES OFICIALES					
LUGAR INSTITUT PASTEUR-CNCM, N.º registro: I-2278    FECHA 6 Agosto de 1999					
(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD					
PAIS DE ORIGEN		COD PAIS	NUMERO	FECHA	
(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P. <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO					
(14) REPRESENTANTE		APELLIDOS		NOMBRE	
				CODIGO	
DOMICILIO		LOCALIDAD		PROVINCIA	
				COD. POSTAL	
(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN				FIRMA DEL FUNCIONARIO	
<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS... <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS... <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N.º DE PAGINAS... <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD		<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input type="checkbox"/> OTROS		FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE	
(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION					
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.				JUAN JOSÉ BADIOLA DIEZ	

I. O.E.P.M. Expediente

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

KRAGI  
Kragi



Center  
Kragi

Fax émis par : 33145688236

CNCM FRANCE

86/88/99 16:13 Pg: 1/1

**CNCM**Collection Nationale  
de Cultures de Microorganismes**INSTITUT PASTEUR**25, Rue du Docteur Roux  
F-75724 PARIS CEDEX 15

Paris, 06 August 1999

Tel : (33-1) 45 68 82 50

Fax : (33-1) 45 68 82 36

Dr Juan José Badiola Díez  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
C/Pedro Cerbuna 12  
Ciudad Universitaria  
SP-50009 ZARAGOZA (Spain)

by Facsimile : (00 34) 976 76 16 12

Re : Registration of a BACTERIUM for the purposes of an original deposit  
under the Budapest Treaty

O/R : CNCM - 7051.908

Dear Sir,

We acknowledge receipt of twelve samples of the bacterium mentioned hereunder, packed in dry-ice, and transmitted for the purposes of an original deposit under Rule 6.1 of the Budapest Treaty. The original documents were included in the parcel.

The biological material is registered on **6 August 1999**  
under the following number:

*Identification Reference**Registration Number***CERBAC99****I-2278**

If a deposit is accepted later on, the CNCM accession number will be identical to the registration number and the date of deposit will be the date of registration.

Yours sincerely,

Simona OZDEN  
Director of the CNCM



## **REGION DE ADN ESPECIFICA DE LA ESPECIE PORCINA Y PROCEDIMIENTO DE DETECCION DE LA MISMA EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS**

La presente invención se refiere a una región de 171 pares de bases, que contiene una región de 161 pares de bases (bp) de ADN, específica del genoma porcino. Esta región es específica comparada con las especies más comúnmente utilizadas en alimentación (bovina, ovina, caprina, ave, conejo, salmónidos y ciervos) y con otras especies (humanos, cánidos y roedores), si bien es común a animales del mismo género (por ejemplo, jabalí).

Se refiere también a un procedimiento para la detección de fraude de productos de la especie porcina en los alimentos, hasta un porcentaje del 0,005%. Asimismo, la invención también comprende el procedimiento para cuantificar el porcentaje de componentes porcinos en los alimentos mediante la amplificación del fragmento anteriormente mencionado y su intensidad, observándose un error máximo del 2-3%.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La espectacular expansión de la producción y el consumo que caracteriza actualmente a las sociedades económicamente desarrolladas ha generado una nueva necesidad: la defensa del consumidor contra los abusos y fraudes derivados del desequilibrio de fuerzas que hay entre consumidores y productores. Uno de estos fraudes consiste en obtener un producto elaborado y no mencionar en la etiqueta que porcentaje del mismo estaba confeccionado con determinados productos bases (por ejemplo, carne de ave o cerdo). Este fraude es especialmente importante

en el caso de la especie porcina, ya que existen determinados sectores de la población que por razones religiosas (religión judía y árabe entre otras) necesitan tener la seguridad de que los alimentos que ellos consumen no deben poseer ningún componente de cerdo. Debido a estas razones, existe una necesidad de poner a punto un procedimiento eficaz y barato para detectar este tipo de fraudes, y en particular, el de la introducción de carne porcina en alimentos que no deben contenerla.

Los primeros análisis llevados a cabo para conocer el origen de los diferentes tipos de carne no estaban basados en biología molecular. Así, se utilizaban estudios de composición química revisados por Crosland en "Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: I: Chemical Composition", *Meat Science*, **40**, 289-302, 1995, estudios mediante electroforesis en gel tal como se describe en Savage, A.W.J., Richardson, R.I., Jolley, P.D., Hargin, K.D y Stewart, C.A. (1995), "Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: II: Gel Electrophoresis". *Meat Science*, **40**, 303-318, mediante microscopía como se describe en Pickering y cols., 1995 "Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: III Microscopy" *Meat Science*, **40**, 319-326, e incluso por inmunología como se muestra en Pickering y cols., "Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: IV: Immunology", *Meat Science*, **40**, 327-336, 1995.

Sin embargo, cada uno de estos métodos presenta sus limitaciones. Los estudios de composición química presentan una gran variabilidad y los mismos autores no recomiendan este tipo de estudios para observar los distintos tipos de productos base de las distintas especies animales que existen en los alimentos. En el caso de la utilización de electroforesis en acrilamida, a pesar de que los resultados

obtenidos son mejores que los anteriores no se obtiene tampoco la diferenciación de los distintos animales que lo componen y se plantea el problema del estudio de las muestras una vez realizados los tratamientos que pueden desnaturalizar las proteínas.

Debido a estas razones se inició el estudio de secuencias de ADN específicas para conseguir detectar la existencia de diferentes especies animales en los alimentos. En un principio los primeros estudios fueron técnicas de dot-blot (análisis de transferencia por puntos) tal como se describe en Chinuki y cols (1990). "Species Identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Science*, **27**, 119-128. Otra de las técnicas utilizadas es el slot-blot o análisis de transferencia en rejilla descrito por Ebbehoj, K.F., Thomsen, P.D. (1991): "Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridation" *Meat Science*, **30**, 359-366, y por Wintero y Thomse(1990): "A comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef" *Meat Science*, **27**, 75-85; los cuales comparan las metodologías tradicionales con el método de "slot-blot" observando una mayor sensibilidad de los métodos basados en la tecnología del ADN. Sin embargo debido a la facilidad y sencillez de la técnica muy pronto la reacción en cadena de la polimerasa de Saiki y col., (1988): "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.. *Science*, **239**, 487-491 fué el método de elección con el fin de detectar fragmentos de especie específicos. Uno de los métodos utilizados hasta el momento es el RAPD-PCR ("Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction", o "reacción en cadena de la polimerasa para ADN polimórfico amplificado al azar"), de forma que el resultado corresponde con distinto patrón de bandas en cada una de las especies Los resultados obtenidos por Koh y cols. (1998), Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification

of red meat animal species, *Meat Science*, **48**, 275-285. en carne roja demuestran que consigue la diferenciación por especies, aunque los resultados resultan siempre un poco ambiguos, ya que, existe el problema de polimorfismos de especies que podría dar una variabilidad no debida a la propia especie. También otros autores como Murray, B.W y col., (1995), "Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA" *J. Forensic Sci.*, **40** (6), 943-951 han utilizado los bucles D del ADN mitocondrial y posterior digestión con enzimas de restricción, así como análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica del citocromo b (cytb) descrita por Meyer y cols., en: "Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple method for Species Identification in Food" *Journal of AOAC International*, **78**(6), 1542-1551 (1995), que es variable según las especies estudiadas. En ambos casos el precio del análisis se ve incrementado debido a la utilización de las endonucleasas.

En relación con la sensibilidad de la técnica, existen diferencias entre las distintas experiencias realizadas hasta el momento. Cuando la mezcla se realiza despues de extraer el ADN los mejores son los obtenidos por Meer y cols(1996), Polymerase Chain Reaction for detection of male tissue in Pork products. *Meat Science*, **44**, 285-291. mediante la amplificación de una región específica del cromosoma Y porcino, pero sólo permite la detección de productos porcinos de machos. En el caso de que la muestra de partida sean mezclas de productos de distintas especies, los que obtienen mejores resultados, en carne no cocinada fueron Wintero y Thomsem en 1990, en las referencias citadas anteriormente, que llegan a detectar un 0,5 % de carne de cerdo en vaca, pero en este caso la técnica utilizada es "slot-blot" o técnica de análisis de transferencia de rejilla, que es una técnica engorrosa y cara para su realización como rutina en el laboratorio. Por último también Meyer y cols.

(1995) Polymerase Chain reaction -Restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. J.of AOAC International, 78, 1542-1551. proponen un método basado en la amplificación del Citocromo b de ADN mitocondrial y posterior digestión con enzimas de restricción para su estudio. En este caso el método es capaz de detectar un 0.5 % de carne porcina en la bovina.

Con respecto a la cuantificación de la cantidad de ADN tras los resultados obtenidos por otros autores, parece que hasta ahora ha sido un problema no fácilmente abordable. Por una parte según Meyer y cols. (1995), en la referencia anteriormente citada, presentan un método en el que se puede "semicuantificar" la cantidad de ADN cuando la proporción de carne porcina se encuentra en el intervalo entre 20 y 5 %, en los otros caso no está claro. De forma similar Wintero y Thomsen apuntan en la referencia citada que tienen gran dificultad para cuantificar mediante Slot-blot la cantidad de una especie u otra presente en la muestra. En este caso, hasta el momento son los métodos tradicionales los que se plantean como más interesantes.

A la vista de las dificultades existentes en la detección de la carne de porcino en alimentos y su importancia en la revelación de fraudes a los consumidores, y a la vista de los antecedentes descritos se plantea como necesidad la puesta a punto de un procedimiento eficaz para resolver este problema. Por lo tanto el uso de la amplificación de una region de ADN específica de la especie porcina para la detección de la existencia de células porcinas en distintos productos alimenticios elaborados o no, es la solución más adecuada, tal como se describe en la presente invención.

De acuerdo con la presente invención se ha aislado una sonda específica de cerdo que ha demostrado tener una altísima sensibilidad y rapidez, además de ser muy económica, ya que no es necesario la

realización de digestiones con enzimas de restricción. Asimismo, se ha puesto a punto un procedimiento para la detección de la presencia de ADN porcino en distintos productos alimenticios. Además la presente invención proporciona un procedimiento para cuantificar el grado de contaminación de ADN porcino en otras especies.

## BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una secuencia de ADN aislada que contiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 1. Asimismo comprende un vector que incluye la secuencia de ADN mostrada en SEC. ID. N°.: 1, y una línea celular transformada con dicho vector.

Los oligonucleótidos cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC. ID. N°.: 2 y SEC. ID. N°.: 3 también forman parte de la presente invención y son capaces de amplificar 161 pares de bases de la SEC.ID. N° I..

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un procedimiento para detectar, mediante una amplificación enzimática basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 161 pares de bases de la secuencia de ADN mostrada en SEC. ID. N°.: 1. en una muestra, que comprende anillar oligonucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean dicha secuencia de ADN o que la incluyen, y polimerizar enzimáticamente copias de dicha secuencia de ADN. Dichos oligonucleótidos que flanquean dicha secuencia pueden ser un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 2 y un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 3. La detección del producto resultante de la amplificación enzimática se lleva a cabo por electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Está prevista además la realización de una reacción de

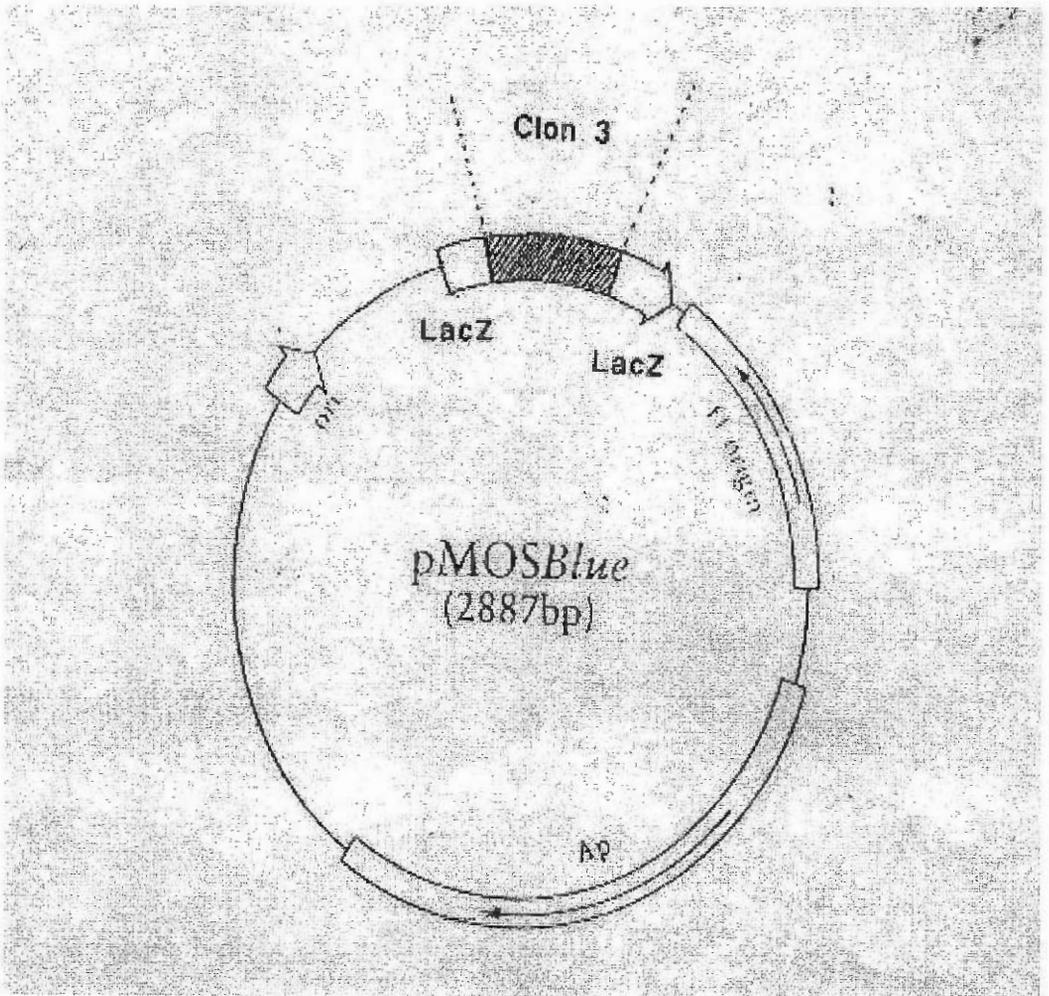
amplificación enzimática previa de un fragmento de ácido nucleico que contiene la región ZFX/ZFY, de 241 pares de bases descrita por Osta y cols., 1994, "Determinación del sexo en embriones mediante PCR en dos etapas, I Jornadas de Biociencia, Madrid.

En otro aspecto adicional la presente invención proporciona un procedimiento para analizar la presencia de distintos componentes porcinos (carne, grasa, vísceras, etc) en un producto alimenticio, mediante la amplificación enzimática y detección de un fragmento de ADN específico del genoma porcino

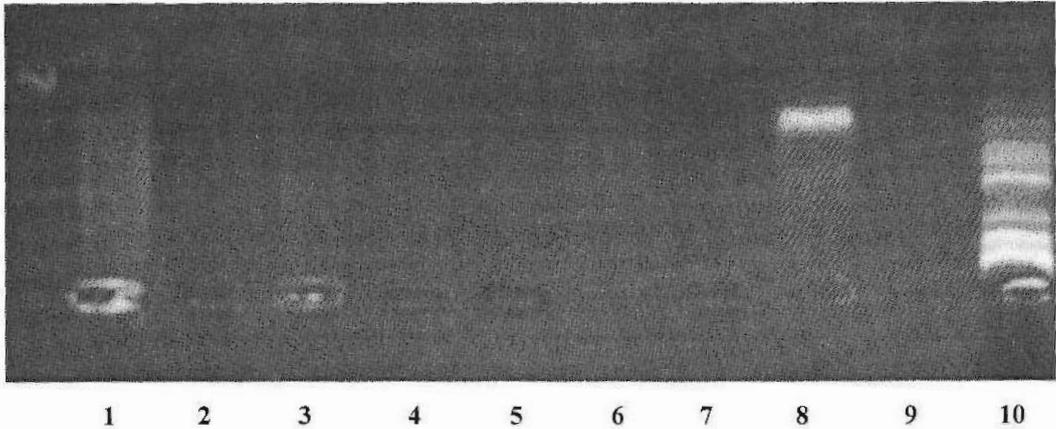
En otro aspecto proporciona un procedimiento para cuantificar el porcentaje de componentes porcinos en un producto alimenticio, mediante la amplificación enzimática y detección de un fragmento de ADN específico del genoma porcino.

## BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

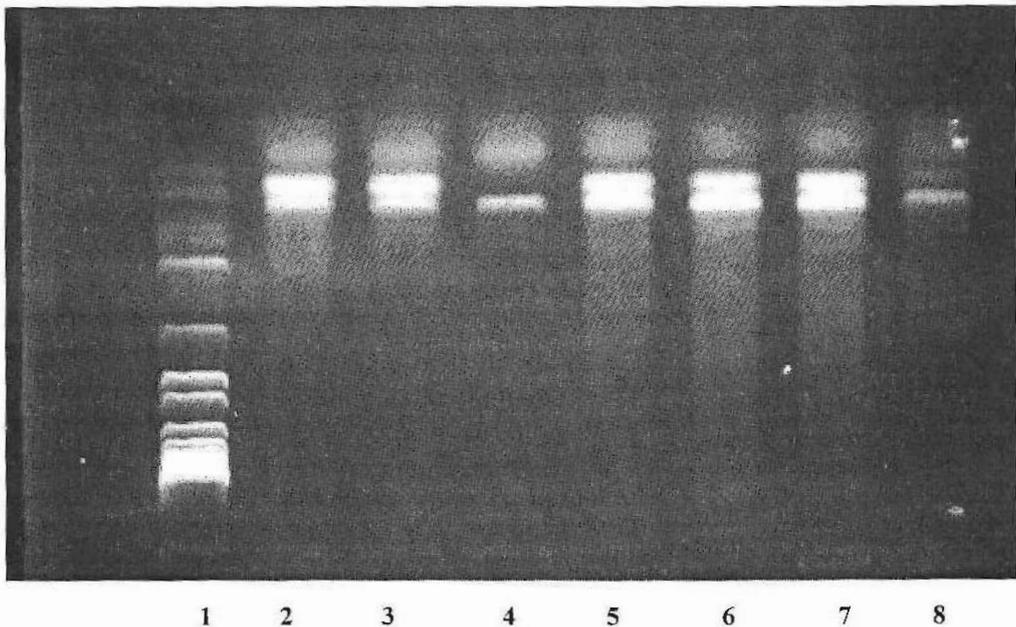
- Figura 1. Plásmido que contiene el clon 3 (fragmento específico de porcino de 171 pares de bases). LacZ: Gen para la enzima  $\beta$ -galactosidasa interrumpida por la secuencia del clon 3. Ap: gen de resistencia a la ampicilina. Ori: Origen del plásmido.



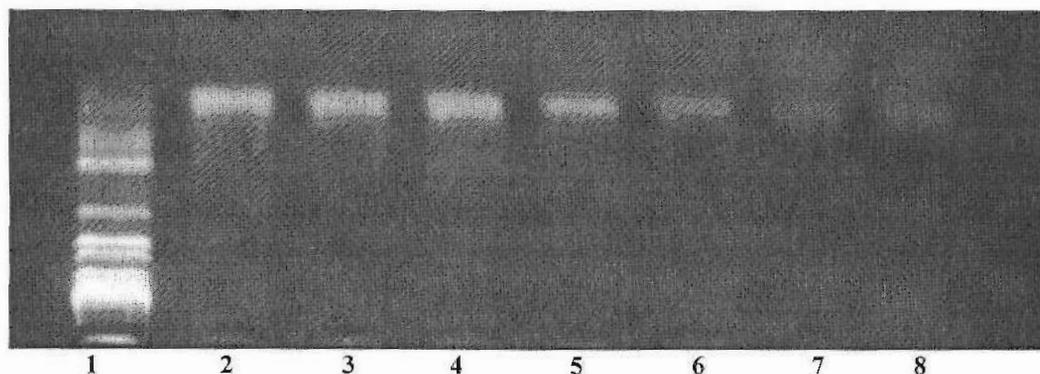
- Figura 2. La figura muestra la amplificación del fragmento de 161 pares de bases, específico de cerdo, en la que las diferentes entradas o calles representan: calle 1: vaca, calle 2: oveja, calle 3: cabra, calle 4: pavo, calle 5: pato, calle 6: pollo, calle 7: ciervo, calle 8: cerdo, calle 9: control negativo y calle 10: marcador de talla (BRL 1Kb, Gibco).



- La Figura 3 representa el control de la amplificación por doble PCR, y en ella las calles muestran: calle 1: marcador de talla (BRL 1Kb, Gibco), calles 2, 3, 5, 6, 7 y 8: cerdo, calle 4: vaca.



- La Figura 4 muestra las diluciones de ADN porcino en ADN bovino (20 ciclos de amplificación del fragmento específico de cerdo), en la cual las calles representan lo siguiente: calle 1: marcador de talla (BRL 1Kb, Gibco), calle 2: 100% cerdo (25 ng), calle 3: 75% cerdo (18,5 ng), calle 4: 50% cerdo (12,5 ng), calle 5: 25% cerdo (6,25 ng), calle 6: 10% cerdo (2,5 ng), calle 7: 2% cerdo (500 pg) y calle 8: 1% cerdo (250 pg).



#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El aislamiento del fragmento de ADN que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°: 1 se consiguió mediante una búsqueda al azar de regiones repetidas en la especie porcina. Se aisló y se secuenció (método de Sanger y cols, 1977, DNA sequencing with chainterminating inhibitors, *PNAS*, **74**, 5463) de este modo una sonda de porcino de 171 pares de bases. Este fragmento fue clonado mediante la utilización del plásmido pMos-Blue (Amershan-Pharmacia). El clon está representado por la Figura 1. La secuencia obtenida fue la mostrada en SEC. ID. N°1:

5'TTAAGGATCCGGCATTGCCGTTAGCTGTGGTGAAGGCTGTAGAC  
GCGGCTCGGATCCTGTGTTGCTGTGGCTCTGGCCTAGGCTGGCGGC  
TACAGCTCCGATTGACCCCTAGCCTGGGAACCTCCATATGCCATGGG  
AGTGGCCCAAGAAATGGCAAAAAAAGACAAAAAG-3'

Dicho fragmento fue comparado con toda la base de datos de secuencias del GenBank observándose una alta homología con distintos genes descritos para la especie porcina y únicamente para ella, lo que hizo suponer que es específico para esta especie. Analizando el resultado se observó que las regiones de los distintos genes eran reconocidas como SINEs ("short inter-spersed elements o elementos dispersos cortos") o presentaban homología con retrovirus porcinos tipo C. Esta es una hipótesis probable ya que dicho fragmento es capaz de leerse como secuencia proteica, lo que hace suponer un posible origen retrovírico.

La homología del fragmento representado con otros fragmentos porcinos es alta pero en ningún caso resultó superior al 81%, especialmente en la parte central del fragmento, presentando una baja homología en los extremos.

Secuencias de nucleótidos sustancialmente homólogas a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 1 también forman parte de la presente invención, así como secuencias complementarias a la secuencia mostrada en SEC. ID. N°.: 1, o a las homólogas definidas anteriormente.

En el ámbito de la presente invención se define la homología como la similaridad de las secuencias consideradas en al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente en al menos un 90 % y aún más preferentemente en al menos 95 %, pudiendo estar las diferencias entre las secuencias de nucleótidos consideradas, distribuidas al azar y a lo largo de la longitud completa de la secuencia.

También forma parte de la presente invención una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar, bajo condiciones estrictas, con cualquiera de las secuencias definidas anteriormente, es decir, la secuencia

mostrada en SEC. ID. N°.:1, sus homólogas, o complementarias de éstas. En este contexto, condiciones estrictas para la hibridación significan, por ejemplo, hibridación a 65 °C en presencia de tampón 2 x SSC: NaCl 0,15 M y citrato sódico 0,005 M.

La presente invención proporciona también los oligonucleótidos cebadores que han sido sintetizados a partir de la secuencia identificada y mostrada en SEC. ID. N°.: 1, para poder realizar sobre el genoma la reacción en cadena de la polimerasa (PCR.) y conseguir de este modo un fragmento de 161 bp. Los oligonucleótidos cebadores tienen las secuencias mostradas en SEC. ID. N°.: 2 y SEC. ID. N°.: 3, y que son las siguientes:

Directo: SEC. ID. N°.: 2 : 5'-GGATCCGGCATTGCCGTTAG-3'

Inverso: SEC. ID. N°.: 3: 5'-GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG-3'

La presente invención se refiere de manera más específica a un procedimiento para analizar la presencia de cualquier componente porcino en un producto alimenticio, mediante la amplificación enzimática y detección de un fragmento de ADN específico del genoma porcino. En esta realización preferida de la invención dicho procedimiento comprende:

- a) proporcionar una muestra del producto alimenticio a analizar;
- b) amplificar enzimáticamente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN mostrada en SEC. ID. N°.: 1, contenido en dicha muestra de producto alimenticio, mediante el empleo de unos oligonucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean, o que incluyen, a dicha secuencia de ADN y polimerizar enzimáticamente copias de dicha secuencia de ADN; y
- c) detectar la presencia de dicho fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN citada en el producto de amplificación.

Para aplicar la técnica PCR sobre muestras de ADN de distintas especies se extrajo ADN de sangre entera de 13 especies como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1- Muestras de ADN de las distintas especies**

- 55 cerdos pertenecientes a distintas razas:
  - 7 animales de raza Pietrain.
  - 6 animales de raza Landrace.
  - 6 animales de raza Large White.
  - 6 animales de raza Chato Murciano.
  - 6 animales de raza ibérica.
  - 6 animales de raza Pie de Noire.
  - 6 animales híbridos (Landrace x Large White) x Duroc.
  - 6 animales híbridos (Landrace x Large White) x Hampshire.
  - 6 animales híbridos Landrace x Large White.
- 45 vacas pertenecientes a distintas razas
  - 5 animales de raza toro de Lidia.
  - 5 animales de raza Pirenaica.
  - 5 animales de raza Rubia Gallega.
  - 5 animales de raza asturiana de las Montañas.
  - 5 animales de raza Asturiana de los Valles.
  - 5 animales de raza Menorquina.
  - 10 animales de raza Holstein.
  - 5 animales de raza Normanda.



- 50 caballos.
- 50 perros.
- 10 ciervos.
- 15 ovejas.
- 5 cabras.
- 3 humanos.
- 2 ratas.
- 2 ratones.
- 1 pollo.
- 1 pavo.
- 1 conejo.

La extracción de ADN a partir de sangre fue realizada mediante el método descrito por Sambrook et al. (1989). "Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press". para las muestras de la especie vacuna, y mediante el método descrito por Lahiri et al. (1992), "A non organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested". *J.Biochem.Biophys.Methods*, 25,193-205. para el resto de las especies.

La amplificación de las muestras de ADN se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l que contenía 25 ng de ADN, 1x de tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM (esto es milimolar), pH 9, KCl 50 mM y 0,1 % de Tritón X-100), 2 mM de  $Cl_2Mg$ , 25  $\mu$ g/ml de BSA (seroalbúmina bovina), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 0,5  $\mu$ M de cada cebador y 2 unidades de Taq (*Thermoaquaticus* polimerasa)

(Promega). La reacción de amplificación fue llevada a cabo mediante un ciclo de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 50°C y 40 segundos a 72°C.

La visualización del fragmento amplificado se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, y posterior tinción con bromuro de etidio, tal como se muestra en la figura 2.

En los 55 animales de la especie porcina estudiados (distintas razas fueron ensayadas, vease tabla 1) la amplificación fue positiva, mientras en el resto de los animales estudiados la amplificación fue negativa.

Para evitar la posible aparición de falsos negativos, es decir, para anular la posibilidad de que alguno de los resultados de la amplificación fuese erróneo, se realizó una PCR doble, utilizando una zona de ADN que fuese común a todas las especies. Con esto se consigue la aparición de una banda de tamaño distinto al del fragmento específico de ADN porcino sea cual fuese la especie en cuestión. A su vez, si la muestra analizada contiene ADN porcino aparecerán dos bandas. Para dicho PCR doble fueron utilizados los cebadores que amplifican la región ZFX/ZFY, que corresponde con un dominio de dedos de zinc, con un tamaño de 241 bp (uno de estos cebadores es el descrito por Aasen y Medrano (1990) Amplification of the ZFX and ZFY genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats, *Biotechnology*, **8**, 1279-1281. y el otro por Osta y cols., 1994, "Determinación del sexo en embriones mediante PCR en dos etapas, I Jornadas de Biociencia, Madrid.). Cuando la muestra analizada presentaba ADN porcino se encontraron dos bandas (161 y 241 bp) en el resto de las muestras solo se observó la banda de 241 bp. La figura 3 queda ilustrada la seguridad de la técnica.

El procedimiento de detección del fragmento específico de ADN porcino se puede aplicar al análisis de productos alimenticios elaborados o no elaborados. Por lo tanto una vez observada la especificidad del

fragmento en ADN, se realizó el estudio del mismo en productos alimenticios, es decir en diversas mezclas de carne sobre las que se realizaron distintos tratamientos por calor, y también en otros productos para ver si al ser productos elaborados no existía ningún problema en la detección de dicho fragmento. En la Tabla 2 se muestran una relación de los productos analizados.

**Tabla 2- Muestras de DNA de carne y productos elaborados.**

- Carne cruda de vaca.
- Carne cruda de cerdo doméstico.
- Carne cruda de pollo.
- Carne cruda de pavo.
- Carne cruda de jabalí (*Sus Scrofa ferus*).
- Carne de vaca tratada a 80°C durante 30 minutos.
- Carne de cerdo tratada a 80°C durante 30 minutos.
- Carne de vaca tratada a 120°C durante 30 minutos.
- Carne de cerdo tratada a 120°C durante 30 minutos.
- Choped.
- Grasa, sebo o Manteca de cerdo.
- Salchichas hechas de carnes de distintas especies.
- Mortadela.
- Jamón Serrano.
- Cabeza de jabalí.
- Jamón curado de Pato.

- Paté de cerdo.
- Paté de Pato de baja calidad.
- Paté de Pato de alta calidad.
- Paté de Salmón.
- Paté de Oca.
- Hamburguesas de Ternera de baja calidad sin cocinar.
- Hamburguesas de Ternera de alta calidad sin cocinar.
- Hamburguesas de Ternera de baja calidad cocinadas.
- Hamburguesas de Ternera de alta calidad cocinadas.
- Hamburguesas de Pollo de baja calidad sin cocinar.
- Hamburguesas de Pollo de alta calidad sin cocinar.
- Hamburguesas de Pollo de baja calidad cocinadas.
- Hamburguesas de Pollo de alta calidad cocinadas.

La extracción de ADN se realizó a partir de 10 mg de la muestra, mediante digestión de la misma en 10 vol. de una solución 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, que contenía 100 mM de EDTA, 0,5% SDS (didecilsulfato sódico) y proteinasa K (0,1 mg/ml) durante 3h a 50°C. Posteriormente se realizaron dos lavados con fenol-cloroformo y se precipitó el ADN con etanol al 100%. La muestra fue tratada con una solución que contenía Ribonucleasa A (50 µg/ml) para eliminar el ARN.

Para las muestras tratadas térmicamente se procedió a la extracción de ADN a partir de 10 mg de muestra en una solución compuesta por Tris-HCl 100 mM, pH 9 conteniendo ClNa 100 mM, EDTA 5 mM, 1 % de SDS y DTT 10 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados con fenol-cloroformo y se precipitó el ADN con

etanol al 100%. La muestra fue tratada con una solución que contenía Ribonucleasa A (50  $\mu\text{g/ml}$ ) para eliminar el ARN.

La concentración de ADN se midió mediante fluorímetro, alicuotándose las muestras a una concentración de 25 ng/  $\mu\text{l}$ .

En el caso de las muestras de carne se realizó la extracción de ADN a partir de 10 mg de carne de bovino y porcino sometida a distintos tratamientos térmicos: carne cocinada (30 minutos a 80°C) y carne sometida a tratamiento por autoclave (30 minutos a 120°C). Después de alicuotar las muestras a una concentración de 25 ng/ $\mu\text{l}$  se realizó la amplificación del fragmento encontrando que en todos los casos la muestra de carne bovina fue negativa, mientras la porcina fue positiva. El objeto de la realización de estas pruebas es para su utilización en carne precocinada. De igual manera con las muestras sometidas a autoclave se debe asegurar que para productos enlatados, que suelen haber sido sometidos a dicho tratamiento para esterilizar las muestras, es posible detectar la presencia de carne porcina con la técnica de la presente invención.

En el caso de las hamburguesas, que son uno de los productos que actualmente se comercializan como productos libres de carne porcina, y como productos puros de ternera, pollo, pato, etc. Se realizó la extracción de ADN de hamburguesas de los siguientes tipos: hamburguesas de vaca de baja calidad (calidad dependiente del precio), de pollo de baja calidad, de vaca de alta calidad y de pollo de alta calidad. A su vez la extracción se realizó tanto de muestras crudas como de muestras cocinadas. Los resultados mostraron que las hamburguesas de baja calidad aparecieron contaminadas mientras que las hamburguesas de alta calidad aparecieron sin contaminar con componentes de porcino. Es de resaltar que los resultados se repitieron tanto en las hamburguesas cocinadas como en las sin cocinar.

El paté es otro producto que puede presentarse en diversas calidades dependiendo de la especie a partir de la cual se obtenga. Se realizaron extracciones de ADN de patés de diversas especies y calidades. Los resultados mostraron que la amplificación resultaba positiva en el paté de cerdo, y en el paté de pato de menor calidad, apareciendo una banda que hacía presumir una alta contaminación de cerdo. En los patés de alto precio de pato, oca y salmón no se observó la amplificación del fragmento, indicando dicho resultado la ausencia de contaminación con carne porcina.

Es de resaltar también la amplificación positiva sobre la grasa, el sebo y la manteca ya que esto permite detectar en las grasas su posible origen porcino.

Otros productos analizados tales como productos hechos a partir de carne porcina resultaron todos positivos (Choped, salchichas hechas de carnes de distintas especies, mortadela, jamón serrano y cabeza de jabalí). El jamón curado de pato resultó negativo a la amplificación del fragmento específico.

El procedimiento de detección de ADN porcino de la presente invención es altamente sensible. Para conocer la sensibilidad de la técnica se realizaron diversas concentraciones y mezclas de carne. Dichas concentraciones fueron realizadas mediante mezclas en diversas cantidades de ADN porcino y ADN de otra especie. La concentración final de cada mezcla es de 25 ng/ $\mu$ l de ADN total. Para cada reacción de amplificación se utilizó 1  $\mu$ l de cada mezcla. Las distintas concentraciones utilizadas se observan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Mezclas y combinaciones de ADN de cerdo en ADN de vaca:

- Mezclas y combinaciones de ADN de cerdo en ADN de vaca, y concentración de ADN porcino por  $\mu\text{l}$  de muestra.
  - 100% vaca, con una cantidad de ADN de cerdo de 0  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y de 25  $\text{ng}/\mu\text{l}$  de ADN de vaca. Esta muestra fue utilizada como control negativo.
  - 100 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 25  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
  - 75 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 18,5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
  - 50 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 12,5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
  - 25 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 6,25  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
  - 10 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 2,5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
  - 5 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 1,25  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .
  - 2 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 500  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .
  - 1 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 250  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .
  - 0,5 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 125  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .
  - 0,1 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 25  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .
  - 0,01 % cerdo, con una cantidad de ADN de cerdo de 2,5  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .
  - 0,005 % cerdo. Con una cantidad de ADN de cerdo de 1,25  $\text{pg}/\mu\text{l}$ .
- Mezclas de carne cruda sin cocinar de cerdo y de vaca:
  - Carne de cerdo cruda.
  - Carne de vaca cruda.
  - 75 % de carne de cerdo en carne de vaca.
  - 50 % de carne de cerdo en carne de vaca.

- 25 % de carne de cerdo en carne de vaca.
  - 10 % de carne de cerdo en carne de vaca.
  - 5 % de carne de cerdo en carne de vaca.
  - 2 % de carne de cerdo en carne de vaca.
  - 1 % de carne de cerdo en carne de vaca.
  - 0,5 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- Mezclas de carne cocinada a 80°C durante 30 minutos de cerdo y de vaca:
    - Carne de cerdo.
    - Carne de vaca.
    - 75 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 50 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 25 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 10 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 5 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 2 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 1 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 0,5 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- Mezclas de carne de cerdo y de vaca sometida a autoclave a 120°C durante 30 minutos:
    - Carne de cerdo.
    - Carne de vaca.
    - 75 % de carne de cerdo en carne de vaca.
    - 50 % de carne de cerdo en carne de vaca.

- 25 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- 10 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- 5 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- 2 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- 1 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- 0,5 % de carne de cerdo en carne de vaca.
- Mezclas de paté de cerdo en paté de pato:
  - Paté de cerdo.
  - Paté de vaca.
  - 75 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 50 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 25 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 10 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 5 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 2 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 1 % de paté de cerdo en paté de pato.
  - 0,5 % de paté de cerdo en paté de pato.

La amplificación del fragmento específico de cerdo se realizó mediante la técnica PCR descrita anteriormente. Fué realizada en un volumen de 25  $\mu$ l que contenía 1  $\mu$ l de las mezclas mostradas en la Tabla 3, 1x de tampón de reacción (10 mM Tris-HCl, pH 9, KCl 50 mM y 0,1% de Tritón X-100), 2 mM de  $Cl_2Mg$ , 2  $\mu$ g/ml de BSA, 0,2 mM de cada dextrirribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 0,5  $\mu$ M de cada cebador y 2 unidades de Taq polimerasa (Promega). La reacción de

amplificación fue llevada a cabo mediante un ciclo de desnaturalización del ADN a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 50°C y 40 segundos a 72°C.

La visualización del fragmento amplificado se llevo a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, y posterior tinción con bromuro de etidio.

En todos los casos la amplificación fue positiva realizando 30 ciclos en el termociclador. La cantidad mínima de ADN detectado fue de 1,25 pg que corresponde a una cantidad inferior al ADN contenido en una única célula. Este resultado prueba la gran sensibilidad de la técnica, y confirma la suposición de que el fragmento utilizado es un retrovirus que se encuentra repetido muchas veces en distintos genes del genoma porcino, ya que no es necesaria la existencia del genoma completo para detectarlo.

Para comprobar que esta sensibilidad es importante también en los productos elaborados se procedió a la amplificación de la zona en distintos porcentajes de carne de cerdo en carne de vaca, utilizando también distintos tratamientos térmicos utilizando la misma metodología descrita anteriormente. Las muestras pueden observarse en la Tabla 3.

Para cada reacción de amplificación se utilizó un control negativo que fue carne cruda de vaca y un control positivo que fue carne de cerdo. Con la técnica anteriormente descrita se llegó a detectar un porcentaje de carne de cerdo en vaca del 0,005 %, en todas la muestras, ya fuesen carne fresca, tratada a 80°C durante 30 minutos, o a 120°C durante 30 minutos (tratada en autoclave).

En otro aspecto la presente invención también proporciona un procedimiento para cuantificar el porcentaje de carne porcina en un producto alimenticio, mediante la amplificación enzimática y detección de un fragmento de ADN específico del genoma porcino, que comprende

a) amplificar y detectar dicho fragmento de ADN,

b) visualizar mediante radiación ultravioleta, digitalizar la imagen obtenida tras la tinción, analizar en transmitancia la intensidad de cada banda y corregir el valor obtenido en cada banda en función de la intensidad mostrada por una banda correspondiente a una muestra de carne porcina pura con el fin de calcular el porcentaje de intensidad que presenta cada banda, y

c) calcular el porcentaje de carne porcina en la muestra de producto alimenticio mediante el empleo de la recta de regresión siguiente:

$$y = 0,918x - 2,221$$

donde

y es el porcentaje de muestra porcina en la muestra de producto alimenticio a analizar; y

x es  $100 \times (a/b)$ , donde "a" es el valor de la intensidad de la muestra problema y "b" es el valor de la intensidad de una muestra de carne 100% porcina.

Esta es una de las aplicaciones más interesantes del fragmento de ADN específico de la especie porcina encontrado. Para obtener dicha cuantificación tras la amplificación de las muestras de distintas concentraciones (véase **Tabla 3**), la visualización mediante rayos ultravioletas se realizó utilizando un aparato de ultravioleta modelo Gel Doc 1000 de BioRad. Después se procedió al análisis en transmitancia de la intensidad de la banda dando cada muestra un pico cuyo valor fue anotado en función del área del pico (aplicación Molecular Analyst).

Debido a que las condiciones de PCR y tinción influyen en la intensidad de las bandas obtenidas se corrigieron los valores obtenidos. La corrección se calculó en función de la intensidad mostrada por la banda

de la muestra porcina pura, correspondiéndose siempre, como se esperaba con la medición más elevada de intensidad, esto permitirá hallar el porcentaje de intensidad que presenta cada banda, Seguidamente se realizó una correlación entre los datos obtenidos del área del pico y porcentaje de ADN de cerdo en ADN de vaca, para ver la fiabilidad de la técnica.

Los resultados observados para 20 y 30 ciclos presentaban una gran sensibilidad. Con 30 ciclos se llegaba a observar hasta un 0,005 % de carne porcina en carne de vaca. Sin embargo, la correlación entre la intensidad de las bandas y el porcentaje de muestra fue de 0,75. En el caso de 25 ciclos, se detectó hasta una cantidad de 0,1 % de carne porcina en carne de vaca pero con una correlación de 0,85. Cuando se realizó la experiencia con 20 ciclos se detectó hasta una cantidad de 1 % de carne porcina en carne de vaca, y se obtuvo una correlación de 0,99. Tras la realización de 7 experiencias (2 mezclas de ADN, 2 mezclas de carne cruda, 2 mezclas de carne sometida a autoclave y una de mezclas de paté) se obtuvo la recta de regresión mostrada anteriormente,  $y = 0,918x - 2,221$ , con una correlación de 0,99:

Con dicha recta es posible el conocer el porcentaje de carne porcina en el alimento, sustituyendo el valor corregido obtenido de la amplificación de la muestra problema por X.

**REIVINDICACIONES**

1. Una secuencia aislada de nucleótidos del genoma porcino seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos de un fragmento específico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N°.: 1;
- b) una secuencia de nucleótidos sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos definida en a);
- c) una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos tal como la definida en a) o b); y
- d) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar, bajo condiciones estrictas, con una secuencia de las definidas en a), b) o c).

2. Un vector que comprende la secuencia de ADN de la reivindicación 1.

3. Una línea celular transformada con el vector de la reivindicación 2.

4. Dos oligonucleótidos seleccionados del grupo formado por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 2 y por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 3.

5. Un procedimiento para detectar, mediante una amplificación enzimática basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una secuencia de ADN según la reivindicación 1, en una muestra, que comprende anillar oligonucleótidos complementarios a las secuencias que

flanquean dicha secuencia de ADN o que la incluyen, y polimerizar enzimáticamente copias de dicha secuencia de ADN.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dichos oligonucleótidos se seleccionan entre un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°: 2 y un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°: 3.

7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la detección del producto resultante de la amplificación enzimática se lleva a cabo por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

8. Procedimiento según la reivindicación 5, que comprende, además, la realización de una reacción de amplificación enzimática previa de un fragmento de ácido nucleico que contiene la región ZFX/ZFY, de 241 pares de bases.

9. Un procedimiento para analizar la presencia de distintos componentes porcinos en un producto alimenticio, mediante la amplificación enzimática y detección de un fragmento de ADN específico del genoma porcino, que comprende:

a) proporcionar una muestra del producto alimenticio a analizar;

b) amplificar enzimáticamente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en la reivindicaciones 5,6 y 7, un fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 1, contenido en dicha muestra de producto alimenticio, mediante el empleo de unos oligonucleótidos complementarios a las secuencias que

flanquean, o que incluyen, a dicha secuencia de ADN de la reivindicación 1 y polimerizar enzimáticamente copias de dicha secuencia de ADN; y

c) detectar la presencia de dicho fragmento de ADN que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 1 en el producto de amplificación.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dichos oligonucleótidos se seleccionan entre un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 2 y un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC. ID. N°.: 3.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la detección del producto resultante de la amplificación enzimática se lleva a cabo por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

12. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende, además, la realización de una reacción de amplificación enzimática previa de un fragmento de ácido nucleico que contiene la región ZFX/ZFY, de 241 pares de bases.

13. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho producto alimenticio es un producto alimenticio elaborado.

14. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho producto alimenticio es un producto alimenticio no elaborado.

15. Un procedimiento para cuantificar el porcentaje de carne porcina en un producto alimenticio, mediante la amplificación enzimática y

detección de un fragmento de ADN específico del genoma porcino, que comprende

a) amplificar y detectar dicho fragmento de ADN según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14,

b) digitalizar la imagen obtenida tras la tinción, visualizar mediante radiación ultravioleta, analizar en transmitancia la intensidad de cada banda y corregir el valor obtenido en cada banda en función de la intensidad mostrada por una banda correspondiente a una muestra de carne porcina pura con el fin de calcular el porcentaje de intensidad que presenta cada banda, y

c) calcular el porcentaje de carne porcina en la muestra de producto alimenticio mediante el empleo de la recta de regresión

$$y = 0,918x - 2,221$$

donde

y es el porcentaje de muestra porcina en la muestra de producto alimenticio a analizar; y

x es  $100 \times (a/b)$ , donde "a" es el valor de la intensidad de la muestra problema y "b" es el valor de la intensidad de una muestra de carne 100% porcina.

RESUMENREGION DE ADN ESPECIFICA DE LA ESPECIE PORCINA Y  
PROCEDIMIENTO DE DETECCION DE LA MISMA EN PRODUCTOS  
ALIMENTICIOS

La presente invención se refiere a una región de 171 pares de bases (bp) de ADN, que contienen una región de 161 pares de bases específica del genoma porcino, a los oligonucleótidos cebadores que flanquean dicha secuencia, al procedimiento para analizar la presencia de dicha secuencia de ADN en una muestra, y en particular al procedimiento de detección de distintos componentes porcinos en alimentos elaborados o no elaborados, mostrando una sensibilidad de hasta el 0,005 % de carne de porcino en una muestra. También se refiere a un procedimiento para cuantificar el porcentaje de carne porcina en los alimentos mediante la amplificación del fragmento anteriormente mencionado y su intensidad, observándose un error máximo del 2-3%.

**Anexo 3: Región de ADN específica de la especie porcina y procedimiento de detección de la misma en productos alimenticios.**  
 "GenBank report" de la secuencia de ADN específica de la especie porcina.

 1: GI = "8777895" [GenBank] Sus scrofa SINE sequence

LOCUS	AF235051	171 bp	DNA	MAM	28-JUN-2000
DEFINITION	Sus scrofa SINE sequence.				
ACCESSION	AF235051				
VERSION	AF235051.1 GI:8777895				
KEYWORDS	.				
SOURCE	pig.				
ORGANISM	Sus scrofa				
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae; Sus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 171)				
AUTHORS	Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.				
TITLE	A quick and more sensitive method to identify pig in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 171)				
AUTHORS	Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (16-FEB-2000) Anatomia, Embriologia y Genetica Animal, Universidad de Zaragoza, 177 Miguel Servet, Zaragoza 50013, Spain				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..171				
	/organism="Sus scrofa"				
	/db_xref="taxon:9823"				
repeat region	1..171				
	/rpt_family="SINE"				
	/rpt_type="dispersed"				
BASE COUNT	40 a	42 c	53 g	36 t	
ORIGIN	1 ttaaggatcc ggcattgccg ttagctgtgg tgaaggctgt agacgaggct cggatcctgt				
	61 gttgctgtgg ctctggccta ggctggcggc tacagctccg attcgaccct agcctgggaa				
	121 cctccatgatg ccatgggagt ggccaagaa atggcaaaaa aagacaaaaa g//				

GOV



GOV

**MANUSCRITO 4: A Quick and More Sensitive Method to Identify Pig in Processed and Unprocessed Food by PCR Amplification of a New Specific DNA Fragment (Artículo 2).**

GOVT



LIBRARY

**2000 JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE  
MANUSCRIPT SUBMISSION AND COPYRIGHT RELEASE FORM**

Send this form and three copies of the manuscript, including photographs, on line-numbered paper to: Technical Editor, Journal of Animal Science, 1111 N. Dunlap Avenue, Savoy, IL 61874. Copies of this form may be submitted independently by various authors if, for example, they are currently located at different institutions. If the manuscript is not accepted for publication, this affidavit shall have no legal effect and may be considered null and void.

PLEASE PRINT OR TYPE

For Office Use:  
\_\_\_\_\_ of \_\_\_\_\_

## 1. Manuscript Title:

A QUICK AND MORE SENSITIVE METHOD TO IDENTIFY PIG IN  
PROCESSED AND UNPROCESSED FOOD BY PCR AMPLIFICATION OF AN EX  
SPECIFIC DNA FRAGMENT

## 2. Name and address of Corresponding Author:

Name JORGE H. CALVO Address Laboratorio de Genética  
Biológica Facultad de Veterinaria y Miguel Servet 177. 50013  
ZARAGOZA, SPAIN  
Telephone (34) 976 761619 Fax (34) 976 761612 E-mail jrcalvo@posta.uniz  
es

## 3. Membership:

I (we) affirm that at least one of the authors is a current member of the American Society of Animal Science.

## 4. Style:

I (we) affirm that the manuscript has been prepared in accordance with the current *Journal of Animal Science* Style and Form guidelines.

## 5. Care and Use of Animals:

I (we) certify that any research that involved animals followed established standards for their care and use. Check one or more of the following boxes:

- Research protocols were approved by an Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC No. \_\_\_\_\_
- Research protocols followed the guidelines stated in the *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*.
- Research protocols followed the guidelines stated in an alternate guide. Name the guide used \_\_\_\_\_
- Other (explain): \_\_\_\_\_

No animals were used in the research reported in this manuscript.

## 6. Assurance of Content:

I (we) have read this manuscript and I (we) hereby affirm that the content of this manuscript or a major portion thereof has not been published in a refereed journal, and that it is not being submitted for publication elsewhere.

## 7. Section Preference:

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Applied Animal Science           | <input type="checkbox"/> Physiology and Endocrinology              |
| <input type="checkbox"/> Breeding and Genetics            | <input type="checkbox"/> Rangeland, Pasture and Forage Utilization |
| <input type="checkbox"/> Environment and Behavior         | <input type="checkbox"/> Rapid Communications: Molecular Genetics  |
| <input type="checkbox"/> Growth and Developmental Biology | <input type="checkbox"/> Ruminant Nutrition                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> Meat Science          | <input type="checkbox"/> Teaching                                  |
| <input type="checkbox"/> Nonruminant Nutrition            | <input type="checkbox"/> Contemporary Issues                       |
| <input type="checkbox"/> Pharmacology and Toxicology      |  |

## 8. Publication Costs:

The current charge for publication is \$85 per printed page in the *Journal* for articles with at least one author who is a current member of ASAS. For articles with no authors who are ASAS members, the publication charge is \$170 per printed page. Page charges include 50 offprints; optional offprints may also be ordered. The following agency or individual will be responsible for publication costs:

Name Jorge Hugo Calvo  
Address Lab. de Genética Biológica Fac. Veterinaria ZARAGOZA  
SPAIN (over)

1871  
MAY 10  
1871

## IDENTIFICATION OF PIG PRODUCTS

Technical note: A Quick and More Sensitive Method to Identify Pig in Processed and Unprocessed Food by PCR Amplification of a New Specific DNA Fragment.

J. H. Calvo<sup>2,3</sup>, P. Zaragoza, R. Osta

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. C/Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza. SPAIN.

<sup>1</sup>Research supported by project UZ210-47

<sup>2</sup>J.H. CALVO was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97).

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed (phone 34 976 761619, Fax 34976 761612, email [jhcalvo@posta.unizar.es](mailto:jhcalvo@posta.unizar.es)).

<sup>4</sup>The authors thank M. Jaime for the revision of the English version.

ABSTRACT: A PCR procedure has been developed and evaluated to detect pork in heated and not heated meat, sausages, tinned food, cured products and pâtés, using a faster, more specific and sensitive method than others previously described. Isolation of a new DNA specific porcine repetitive element has been performed by inespecific PCR amplification. After analysing this repetitive sequence, a pair of primers has been synthesized. To confirm the effectiveness and specificity of this fragment, 55 pig blood DNA (from differents breeds) have been tested obtaining positive results. With 200 samples tested from other species the specific pork amplification was not detected. Using this method we can semiquantify degree contamination, depending on the PCR amplification cycles, detecting up to 0.005% and 1% pork in beef and pig in duck pâté using 30, and 20 PCR amplification cycles respectively. The amount of pig DNA detected in cattle DNA was 1.25 pg and 250 pg when using 30 and 20 amplification cycles respectively. Pork has been identified in both heated and non-heated meat products, sausages, tinned food, hamburgers and pâtés.

In conclusion, specific PCR amplification of a repetitive DNA element seems to be a powerful technique for the identification of pork in processed and unprocessed food, because of its simplicity, specificity and sensitivity (with 30 amplification cycles we can detect 0.005% pork). Furthermore, it is a very fast method, since 1% pork contamination can be detected with 20 PCR cycles, being also much cheaper than other

methods based on RFLPs-PCR, inmunodifusion and other techniques which need expensive equipment.

Key Words: Pig, Species identification, Contamination, Fraud.

### Introduction

There has been a tremendous growth in quality products consumption, and a change in attitudes at this respect. Nowadays, consumers demand quality products, which have to be well labeled. However, fraudulent or uninintentional mislabeling still exists which may not be detected resulting in a poor quality of the product. On the other hand, some population groups such as vegetarians, Jewish and Arabics do not desire to eat pork. This population demand methods to detect pork in food.

Numerous analytical methods, which rely on proteins analysis have been developed for pork identification such as electrophoresis techniques (Kim and Shelef, 1986, Skarpeid *et al.*, 1998), liquid chromatograpy (Ashoor *et al.*, 1998) and inmunoassays (Jones *et al.*, 1985, Hsieh *et al.*, 1998). However, proteins lose their biological activity after animal death, and their presence and caracteristiques depend on the cell types. Furthermore, most of them are heat labile. Thus, for species identification, a DNA rather than protein analysis would be preferable.

Dot-blot technique was the first genetic approach for determination of species identity (Wintero *et al.*, 1990, Ebbehøj y Thomsen, 1991). At present, however, PCR is the technique of choice for species identification (Céspedes *et al.*, 1999). Some PCR approaches are RAPD-PCR (Lee and Chang, 1994), DNA mitochondrial D-loop analysis (Murray *et al.*, 1995) and RFLPs analysis of different PCR fragments (Meyer *et al.*, 1995, Borgo *et al.* 1996; Ram *et al.*, 1996, Matssunaga *et al.*, 1999). In this work we have focused on obtaining a new and more sensitive DNA probe to detect pig DNA in different processed and unprocessed food samples. A method for pork identification is presented on the basis of PCR amplification of species-specific DNA fragment, which can be applied to the detection of fraudulent or unintentional mislabeling of this species.

#### Material and Methods

*Probe isolation.* A 171 b.p. DNA fragment was isolated (GenBank accession number AF235051), by using non specific primers in order to obtain a non-specific amplification. After running the PCR in an agarose TBE gel, the most intensive band was selected. The fragment was then cloned (pMOSblue, Amersham Pharmacia) and sequenced (Sanger *et al.*, 1977). The obtained sequence was analysed in databases (genbank, EMBL).

*Sample selection and DNA extraction.* In order to test the specificity of the technique, 250 unrelated blood samples from several species and breeds

were analysed (table 1). Genomic DNA was extracted according to a previously described procedure (Lahiri *et al.*, 1992).

Meat samples were taken with a pair of scissors. Samples containing 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 and 100% pork in beef were taken, each with a total weight of 0.5 g. Meat samples were heated at 50, 80 and 120°C respectively, using a holding period of 30 minutes. Raw samples were also analysed. In the same way, pork and duck pâté mixtures were made containing 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 and 100% pork each, weighing 0.5.

Other food products were also analysed to verify whether they contained pig cells (Table 2). Genomic DNA was extracted according to a previously described procedure (Sambrook *et al.*, 1989).

*PCR amplification of specific fragment of pig DNA.* The set of primers used for PCR specific pig amplification was chosen from the 171 b.p. fragment isolated. The primers were designed as follows: 5'-GGATCCGGCATTGCCGTTAG-3' (forward primer) and 5'-GTCTTTTTTTGCCATTTCTTGG-3' (reverse primer).

Double-stranded amplifications were carried out in a final volume of 25µl, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 20 pmol of each primer, 20 ng of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Thirty cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at

94°C for 30 s, primer annealing at 50°C for 30 s, and primer extension at 72°C for 30s. The last extension step was 5 minutes longer. An initial denaturation at 94°C for 4 minutes was performed to improve the final result. Electrophoresis of a 10µl portion of the amplification was carried out for 45 min at 100 V in a 2% agarose gel, containing ethidium bromide (1µg/ml) in TBE buffer. DNA fragment was visualized by UV transillumination.

*Sensitivity.* Mixtures between pig DNA and cattle DNA were made to detect the minimum quantity of DNA. Samples containing 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 and 100% pig DNA in cattle DNA were taken. Furthermore, mixtures of pork and beef, and pork and duck pâté were analysed, extracting the DNA from the mixture (mixtures are described in sample selection and DNA extraction). For this purpose, a PCR in a final volume of 25µl was carried out, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 20 pmol of each primer, 25 ng of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The primers used were forward and reverse primers. The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Three experiments were performed with thirty, twenty-five and twenty cycles with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 50°C for 30 s, and primer extension at 72°C for 30s. The last extension step was 5 minutes longer. An initial denaturation at 94°C for 4 minutes was performed to improve the final



result. Electrophoresis of a 10 $\mu$ l portion of the amplification was carried out for 45 min at 100 V in a 2% agarose gel, containing ethidium bromide (1 $\mu$ g/ml) in TBE buffer. DNA fragment was visualized by UV transillumination.

### Results and Discussion

Our initial hypothesis was that the most intensive band isolated by an inespecific PCR was an element, which is spread and highly repeated in the genome. After sequencing, the obtained sequence was compared with databases (AF235051), which showed a high homology with a SINEs motif in a lot of pig genes and with pig retrovirus type C (the maximum homology found was 82%). Those homologies confirm our initial hypothesis about the isolation of repetitive elements using inespecific amplifications. Oligonucleotides used as primers for porcine-specific PCR were based on the sequence isolated. A 161 b.p. amplification was obtained (Figure 1). To confirm the effectiveness and the specificity of this fragment it was tested in 55 pig blood DNA, from nine different breeds and crosses, obtaining the 161 b.p. specific pig band. With 200 samples tested from other species the positive amplification was not obtained (table 1).

The total amount of DNA and the percentage of pork in the samples is an important data to verify the sensitivity of the method. At this respect, Wintero and Thomsen (1990) can detect a 0.5% of pork in beef, Meyer *et*

*al.* (1995) can detect pork in heated beef mixtures at levels below 1% with a fragment of the cyt c with 30-35 amplification cycles, and Matsunaga *et al.* (1999) detect 250pg using 35 amplification cycles. In pig-cattle DNA mixtures, we detected up to 1.25 pg pig DNA in cattle DNA with 30 amplification cycles. This amount corresponds, in the pig-cattle mixtures, to 0.005% pig DNA in cattle DNA. With 25 and 20 amplification cycles, 0.1% pig DNA in cattle DNA (25pg), and 1% (250pg) respectively (Figure 2). Consequently, depending on the amplification cycles pork contamination can be semiquantified. No differences were found between the results of DNA mixtures, pork and beef mixtures, and pâté mixtures, nor between the heat treatment in the pork and beef mixtures, including autoclaved at 120°C for 30 minutes.

In order to identify pork in a large number of both processed and unprocessed foods (Table 2), PCR amplifications were carried out without finding any discordant result up to now. With this fragment amplification pork has been detected in mixtures treated at different temperatures, including autoclaved products (tinned products). Some commercial products were analysed which normally have pork in their composition: chopped, sausages, ham, salted ham, cured products, pig fat, pork being detected in all cases. In hamburgers labeled as chicken, beef and turkey, pork was detected in some cases. Hamburgers without labelling but sold as having 100% beef or chicken components showed that they all contained pork which, apart from being a fraud, entails a serious religious problems

among Jewish and Arabic populations. Finally, pork, duck, goose and pork-duck pâté samples, both tinned and bought by weight, were also analysed. Pâtés labelled as having pork, it was detected by specific PCR amplification. Good quality high-priced duck pâtés did not present pork as a component. However, low quality duck pâtés, included pork which had not been specified in the label.

In conclusion, specific PCR amplification of this fragment is a powerful technique for the identification of pig, due to its simplicity, specificity and sensitivity (with 30 amplification cycles we can detect 0.005% pork). Furthermore, it is a very fast method, since 20 PCR cycles can detect 1% pork contamination in only a few hours, without a posterior digestion.

However, further research would be needed in order to develop a quantitative method since this simple PCR analysis is only semiquantitative. With respect to pork quantification, the cause of a positive result should be clarified according to whether it is due to adulteration of the product or inadequate handling during manufacture in exceptional cases. Meyer *et al.* (1994) do not consider it desirable to have a detection limit below 0.1% pork. However, Jewish and Arabic population consider it desirable to have a detection limit as low as possible.

In our laboratory, assays for species identification by PCR are in preparation to detect contamination in cheeses, pâtés and other products.

### Implications

Pig identification has several important applications in food industry, not only to detect falsely labelled products, but also for economic, religious and health reasons. Therefore, we developed a simple and specific pig PCR, providing a powerful method to detect mislabeling or willful as well as fraudulent substitution. This is one of the most sensitive methods described up to now. Furthermore, it is a very fast method, detecting up to 1% pork just with 20 amplification cycles, and it has been tested in heated and not heated meat, sausages, tinned food, cured products and pâtés. Besides, it is cheaper than other methods based on RFLPs-PCR, inmunodifusion or other techniques which need expensive equipment.

### Literature Cited

- Ashoor, S.H.; Monte, W.C.; Stiles, P.G. 1998. Liquid chromatographic identification of meats. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(2): 397-403.
- Borgo, R.; Soulie-Crosset, C.; Bouchon, D.; Gomot, L. 1996. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food Sci.* 61: 1-4.
- Céspedes, A.; García, T.; Carrera, E.; Gonzalez, I.; Fernández, A.; Hernández, P.E.; Martín, R. 1999. Identification of Sole (*Solea solea*) and

Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1046-1050.

Ebbehoj, K.F.; Thomsen, P.D. 1991. Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridation. *Meat Sci.* 30: 359-366.

Hsieh, Y.H.; Sheu, S.C.; Bridgman, R.C. 1998. Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *J. Food Prot.* 61 (4): 476-481.

Jones, S.L.; Patterson, R.L.S. 1985. Double antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.* 15: 1-13.

Kim, H.; Shelef, L.A. 1986. Characterization and identification of raw beef, pork, chicken and turkey meats by electrophoretic patterns of their sarcoplasmis proteins. *J. Food Sci.* 51:731-741.

Lahiri, D.K., Bye, S., Nurnberger, J.I. Jr, Hodes, M.E. and Crisp, M. 1992. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic ADN from whole blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Methods* 25 (4): 193-202.

Lee, J.C. and Chang, J.G. 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.* 67(2): 103-107.

Lee, J.C.; Chang, J.G. 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.* 67(2): 103-107.

Matssunaga, T.; Chikuni, K.; Tanabe, R.; Muroya, S.; Shitaba, K.; Yamada, J.; Shinmura, Y. 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* 51: 143-148.

Meyer, R.; Candrian, U.; Lüthy, J. 1994. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77(3): 617-622.

Meyer, R.; Hofelein, C.; Luthy, J.; Candrian, U. 1995. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple method for Species Identification in Food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 78(6): 1542-1551.

Murray, B.W.; McClymont, R.A.; Strobeck, C. 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J. Forensic Sci.* 40(6): 943-951.

Ram, J.L.; Ram, M.L.; Baidoun, F. 1996. Authentication of tuna and bonito by sequence restriction site of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2460-2467.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sanger, F.; Nicklen, D.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

Sanger, F.; Nicklen, D.; Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

Skarpeid, H.J.; Kvaal, K.; Hildrum, K.I. 1998. Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectricfocusing protein profiles. *Electrophoresis* 19(18): 3103-3109.

Wintero, A.K.; Thomsen, P.D.; Davies, W. 1991. A comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Sci.* 27: 75-85.

Table 1. Species blood samples analysed to test the specificity of the technique.

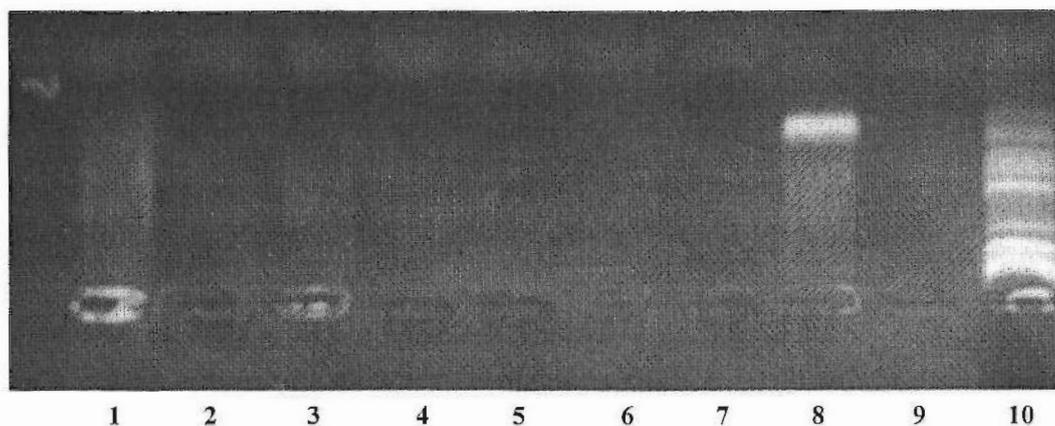
---

- 55 pigs from several breeds (6 animals for breed): Pietrain breed - Landrace breed - Large White breed- Chato Murciano breed - Ibérico breed - Pie de Noire breed - (Landrace x Large White) x Duroc breed - (Landrace x Large White) x Hampshire breed - Landrace x Large White breed.
  - 75 ruminants: 45 cattle animals - 15 sheep - 5 goat - 10 deer
  - 8 poultry animals: 5 chicken - 3 turkey
  - Other samples: 3 rabbits - 50 horses - 50 dogs - 3 humans - 2 rats - 2 mice
-

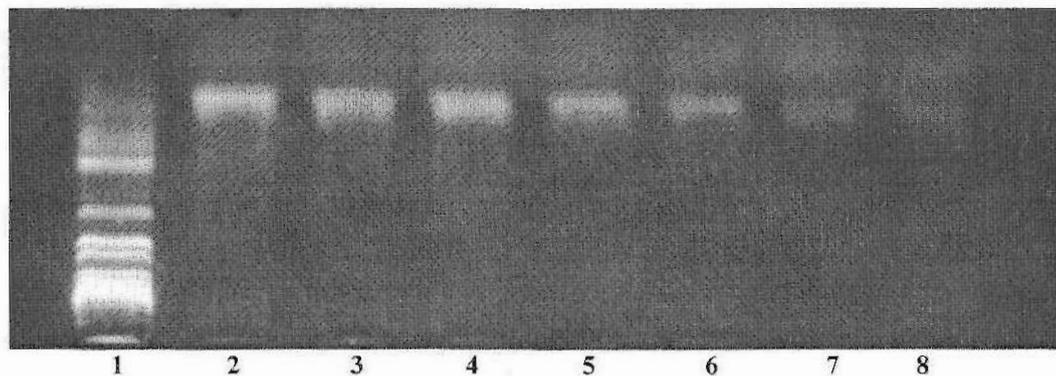
Table 2. Food products analysed.

- 
- Sausages: 2 Pork chopped - 2 Pork sausages - 5 Meat mixtures sausages - 2 Pork ham - 1 Pork salt ham - 2 Duck ham - 1 chorizo sample - 1 Salami-type sausage -
  - Meats: 2 Duck meat - 2 Turkey meat - 5 Beef - 5 Pork - 1 Lamb - 2 Chicken meat - 2 Rabbit meat
  - Hamburgers: 2 Pork hamburgers - 5 Chicken hamburgers - 2 Pork and beef hamburgers - 5 Beef hamburgers - 2 Pork and chicken hamburgers
  - Pâtés: 7 Pig pâté - 1 Foie Pâté - 10 Pig and duck pâté - 1 Fish pâté - 1 High quality duck pâté - 1 Low quality duck pâté
  - Pig fat.
-

**Figure 1.** 161 b.p. PCR amplification. Line 1: cattle, line 2: sheep, line 3: goat, line 4: turkey, line 5: duck, line 6: chicken, line 7: deer, line 8: pig, line 9: negative control, line 10: BRL 1Kb marker (Gibco).



**Figure 2.** Sensitivity of the technique with 20 amplification cycles. Line 1: BRL 1Kb marker (Gibco), line 2: 100% pig (25ng), line 3: 75% pig (18.75ng), line 4: 50% pig (12.5ng), line 5: 25% pig (6.25ng), line 6: 10% pig (250pg), line 7: 2.5% pig (500pg), line 8: 1% pig (250 pg).



---

**MANUSCRITO 5: DNA Fingerprinting for Detection of Bovine, Ovine and Caprine Cheese (Artículo 3)**



---

Mary Swenson, 16:37 1/06/00 -05, JDS manuscript receipt

---

From: "Mary Swenson" <marys@assochoq.org>  
Organization: Association Headquarters  
To: jhcalvo@posta.unizar.es  
Date: Thu, 1 Jun 2000 16:37:20 -0500  
Subject: JDS manuscript receipt  
Priority: normal

JOURNAL OF DAIRY SCIENCE  
Editorial Department

Dear Author,

Your Manuscript#0180, "DNA Fingerprinting for Detection of Bovine, Ovine and Caprine Cheese"

has been received and is being sent to reviewers. Your paper should be through review within 2-3 months. Please feel free to contact the ADSA editorial office at [adsa@assochoq.org](mailto:adsa@assochoq.org) if you have questions about the status of your paper during the review stage. Manuscript evaluations and author proofs will be sent to the corresponding author indicated on the submission form. In order to avoid delays in receiving your proofs, please send changes of address to [marys@assochoq.org](mailto:marys@assochoq.org) or phone 217/356-2426 ext 20.

Members pay lower page charges. If you are not a member of ADSA, please return a copy of this memo with your address and we will send you \_\_\_\_\_ (quantity) membership applications.

Thank you for your submission.

Mary Ann Swenson  
FASS Business Office  
Manuscript Tracking  
1111 North Dunlap Avenue  
Savoy, IL 61874

Tel: 217/356-2426 extn 20  
Fax: 217/356-5371  
email: [marys@assochoq.org](mailto:marys@assochoq.org)

"Thousands of years ago, cats were worshipped as gods.  
Cats have never forgotten this." -- Anonymous



OUR INDUSTRY TODAY

**DNA Fingerprinting for Detection of Bovine, Ovine and Caprine Cheese.**

**J. H. Calvo<sup>1</sup>, R. Osta, I. Zarazaga, P. Zaragoza.**

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. C/Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza. SPAIN.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (phone 34 976 761619, Fax 34976 761612, email [jhcalvo@posta.unizar.es](mailto:jhcalvo@posta.unizar.es)).

## ABSTRACT

A new procedure was developed and evaluated to detect cheese species composition by randomly amplified polymorphic DNA. Nowadays, some fraudulent or unintentional mislabeling exists that can be undetected, resulting in a lower quality of the product. This situation has prompted research to find a new method for the detection of cheese species composition. The randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method was used to generate fingerprint patterns for cattle, ovine and caprine. To confirm the effectiveness and the specificity of this method 45 cattle, 15 sheep and 5 goat blood DNA respectively (from different breeds) have been tested obtaining specific results for each species. Sensitivity of the method was studied by DNA dilution in each species, detecting an amount of DNA up to 25 pg in all species. Isolation of DNA from 22 cheeses was carried out, obtaining an optimal DNA to use as template DNA in PCR. RAPD-PCR pattern was useful to identify cheese species composition in the cheeses studied. This study demonstrates the usefulness of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting to distinguish among the three species in cheese. This is a cheaper method than others based on RFLPs-PCR, ELISA or other techniques which need expensive equipment.

**(Key words:** ovine, bovine, caprine, species identification, randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic fingerprinting)

**Abbreviation key:** PCR = polymerase chain reaction, RAPD = randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay.

## INTRODUCTION

The problem of substitution or adulteration of cheese, whether by accident or intentionally, is not a new one. Determining cheese species composition is an integral part of food regulatory control with respect to economic fraudulence. Apart from possible economic loss, correct species identification is important for the consumer for other reasons such as medical requirements of individuals who may have specific food allergies or religious restrictions. This situation has prompted research to find methods for the detection of the origin of cheese.

Numerous analytical methods, which rely on proteins analysis, such as capillary gas chromatography (Prager, 1989), and ELISA method (Rodriguez et al., 1990; Anguita et al., 1997) have been developed for cow identification in cheeses.

Some approaches to identify cattle, ovine and caprine products in food using DNA techniques have been used. Applications of the polymerase chain reaction (PCR) to food analysis have proliferated because of the simplicity, specificity and sensitivity of this technique for the examination of food components (Meyer et al., 1995; Céspedes et al., 1999) or for monitoring of microorganisms (Gillespie et al., 1999). Meyer et al. (1995),

identify cattle using a PCR-RFLP in meat products, but not in milk products. Chikuni et al. (1994) identify sheep and goat in meat. These new approaches are alternatives to immunological (Rolland et al., 1995) and DNA hybridation methods (Ebbejoj and Thomsen, 1991) for species identification.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint has been used for subtyping bacterial species (Lipman et al., 1996), and characterization of breeds (Gwakisa et al., 1994). Since our purpose was the identification of milk source in cheeses a new DNA fingerprint to detect milk source in cheese composition has been developed, which can be applied in the detection of fraudulent or unintentional mislabeling in cheese.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Sample Selection and DNA Extraction**

In order to test the specificity of the technique, 70 unrelated blood samples (45, 15, 10 samples from cattle, sheep and goat respectively) were analysed. Genomic DNA was extracted according to a previously described procedure (Lahiri et al., 1992).

Furthermore, 25 different cheeses having in their composition milk from cattle, sheep and goat (6 cattle, 4 sheep, 4 goat, 4 cattle-sheep, 3 cattle-goat, 1 sheep-goat and 3 cattle-sheep-goat) were analysed. Genomic DNA was extracted from 100 mg of cheese adding 0.5 ml of 500 mM Tris

(pH 8.0), 100 mM ClNa, 100 mM EDTA, 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 10mM DTT and 100  $\mu$ g of proteinase K. The sample was incubated at 55°C for 2h. Protein was precipitated by addition of 200  $\mu$ l of saturated NaCl (0.5 M) followed by agitation and centrifugation (7000 x g) for 15 minutes at 4°C. The supernadant was subjected to phenol-chloroform extraction. Two volumes of cold ethanol were added, and the solution was kept at -80°C for 1 h. The resulting DNA precipitated was collected by centrifugation (7000 x g) for 30 minutes at 4°C and then washed in 70% ethanol, vacuum dried, and resuspended in 30  $\mu$ l of buffer [Tris (10 mM) – EDTA (1.0 mM), pH 7.5].

### **DNA Fingerprinting and Gel Electrophoresis**

The set of primers used for RAPDs amplification were designed as follows: AGGACGCCTTCCGATACATG (forward primer) and CAGAAGGTCTTGGAGATGGC (reverse primer).

Double-stranded amplifications were carried out in a final volume of 25 $\mu$ l, containing 10 mM Tris-HCl, ph 8.8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 20 pmol of each primer, 30 ng of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Thirty cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94°C for 1 minute, primer anneling at 48°C for 1 minute, and primer extension at 72°C for 1 minute. The last extension step was 5 minutes

longer. An initial denaturation at 94°C for 4 minutes was performed to improve the final result. Electrophoresis of a 10µl portion of the amplification was carried out for 45 min at 100 V in a 3% agarose gel, containing ethidium bromide (1µg/ml) in TBE buffer. DNA fragment was visualized by UV transillumination and was photographed with type 55 Polaroid film (Polaroid Corp., Cambridge, MA).

### **Sensitivity**

Samples containing 2500, 250, 100, 50, 25, 10 and 5 pg/µl cattle, ovine and caprine DNA by dilution were taken. For this purpose, a PCR was carried out in a final volume of 25µl, containing 10 mM Tris-HCl, ph 8.8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 20 pmol of each primer, 25 ng of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The primers used were described in Fingerprint and Electrophoresis section. The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler in a final volume of 25µl, containing 10 mM Tris-HCl, ph 8.8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 20 pmol of each primer, 1 µl of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Thirty cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94°C for 1 minute, primer annealing at 48°C for 1 minute, and primer extension at 72°C for 1 minute. The last extension step was 5 minutes longer. An initial denaturation at

94°C was performed for 4 minutes to improve the final result. Electrophoresis of a 10µl portion of the amplification was carried out for 45 min at 100 V in a 3% agarose gel, containing ethidium bromide (1µg/ml) in TBE buffer. DNA fragment was visualized by UV transillumination and was photographed with type 55 Polaroid film (Polaroid Corp., Cambridge, MA).

## RESULTS AND DISCUSSION

RAPD profiles were analysed *de visu*. The obtained fingerprint patterns were reproducible within the particular species under the same controlled conditions. Reproducibility was checked by subjecting 70 unrelated blood samples (45 cattle, 15 sheep, 10 goat) to the same PCR and electrophoresis conditions. Primers used showed good and specific fingerprint patterns for each species studied (Figure 1). Bovine fingerprint showed two specific bands of 290 and 310 b.p. Sheep profile showed a specific band near 750 b.p. In the same way, a specific band of 340 b.p. was obtained in goat profile.

In order to verify the sensitivity of the method several DNA dilutions were made. It was possible to detect up to 25 pg of DNA in the three species studied. This quantity of DNA corresponded to 1/10000 dilution of DNA.

For identification of cheese composition, PCR amplifications were carried out in several cheeses composed of different milks. Extraction of DNA from cheese and other food matrices for subsequent use in PCRs is often considered to be a problem (Rossen et al., 1992). Our work has shown

that DNA extracted from cheese, by using the method described, can be successfully used as template DNA in PCR. Fingerprints from cattle, sheep and goat cheese showed the same DNA fingerprint patterns as those described for blood samples for each species (Figure 2). All cheeses, containing cattle, showed the two specific bands (Figure 2), an interesting finding considering that most frauds in cheese are for cow milk inclusion in goat or sheep cheeses. Cheese made of milk mixtures from the three species showed specific profiles for each species composition. Every cheese mixture showed the addition of the milk species source profile. For example, cow and sheep cheese profile is the addition of cow and sheep profile. To make the species composition identification easy, known bovine, caprine and ovine samples profiles can run together with the cheese samples from unknown species.

Thus, by using this PCR-RAPD method the species composition of the cheeses can be claimed. However, further research would be needed in order to develop a quantitative method since this simple PCR analysis is only qualitative. In conclusion, results of this study clearly demonstrate the capability of RAPD fingerprint to distinguish milk mixtures in cheesemaking with a simple PCR. This is a cheaper method than others based on RFLPs-PCR (which requires further digestions), ELISA or other techniques which need expensive equipment.

### Acknowledgements.

The authors thank M. Jaime for the revision of the English version. J.H. Calvo was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97).

### REFERENCES

- Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A.I., Gonzalez, I., Sanz, B. and Hernandez, P.E. 1997. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Food Prot.* 60(1): 64-66.
- Céspedes, A.; García, T.; Carrera, E.; Gonzalez, I.; Fernández, A.; Hernández, P.E.; Martín, R. 1999. Identification of Sole (*Solea solea*) and Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1046-1050.
- Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M. and Monma, M. 1994. Polymerase chain reaction for detection of sheep and goat meats. *Meat Science* 37: 337-345.
- Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D. 1991. Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridation. *Meat Science* 30: 359-366.
- Gillespie, B.E., Owens, W.E., Nickerson, S.C. and Oliver, S.P. 1999. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from Heifer mammary secretions and from Horn flies. *J. Dairy Sci.* 82: 1581-1585.

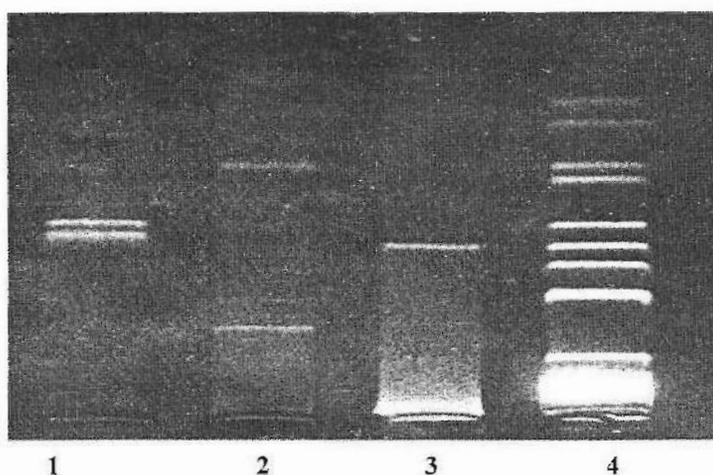


- Gwakisa P.S., Kemp S. J. and Teale A.J. 1994. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim. Genet.* 25 (2):89-94.
- Lahiri, D.K., Bye, S., Nurnberger, J.I. Jr, Hodes, M.E. and Crisp, M. 1992. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic ADN from whole blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Methods* 25 (4): 193-202.
- Lipman, L.J.A., De-Nijis, A., Lam, T.J.G.M., Rost, J.A., Van-Dick, L., Schukken, Y.H. and Gaastra, W. 1996. Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. *Vet. Microbiol.* 48: 51-55.
- Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., Candrian, U. 1995. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple method for Species Identification in Food. *J. AOAC* 78(6):1542-1551.
- Prager, M.J. 1989. Differential characteristics of fatty acids in cheese from milk of various animal species by capillary gas chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72(3): 418-421.
- Rodriguez, E., Martin, R., Garcia, T., Hernandez, P.E. and Sanz, B. 1990. Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Dairy Res.* 57(2): 197-205.
- Rolland, M.P., Bitri, L. and Besancon, P. 1995. Monospecificity of the antibodies to bovine alphas1-casein fragment 140-149: application to the

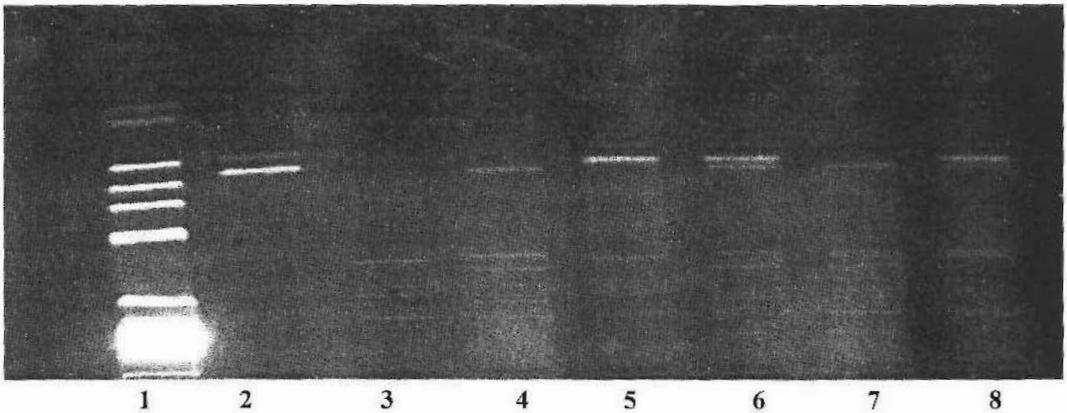
detection of bovine milk in caprine dairy products. *J. Dairy Res.* 62(1): 83-88.

Rossen, L., Norskov, K., Holmstrom, K. and Rasmussen, O.F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extractions solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17: 37-45.

**Figure 1.** Results of RAPD-PCR fingerprinting from blood samples. Line 1: cattle, line2: sheep, line 3: goat, line 4: Brl 1Kb marker (Gibco). Cattle fingerprint shows two specific bands of 290 and 310 b.p. Sheep profile shows a specific band near 750 b.p. In the same way, a specific band of 340 b.p. is obtained in goat profile.



**Figure 2.** Results of RAPD-PCR fingerprinting from cheese. Line1: Brl 1Kb marker (Gibco), line 2: cattle, line 3: sheep, line 4: goat, line 5: cattle - sheep, line6: cattle - goat, line 7: sheep – goat, line 8: cattle - sheep- goat. Cattle fingerprint shows two specific bands of 290 and 310 b.p. Sheep profile shows a specific band near 750 b.p. In the same way, a specific band of 340 b.p. is obtained in goat profile. Milk mixture cheeses showed the addition of each specie profile.





**MANUSCRITO 6: Random Amplified Polymorphic DNA  
Fingerprints for Identification of Pâté Poultry Species  
(Artículo 4)**



POULTRY SCIENCE  
MANUSCRIPT SUBMISSION AND COPYRIGHT RELEASE FORM

This form must be completed and submitted with the manuscript. Copies of this form may be submitted independently by various authors if, for example, they are currently located at different institutions. If the manuscript is not accepted for publication, this affidavit shall have no legal effect and will be considered null and void.

PLEASE PRINT OR TYPE

- Manuscript Title: RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA FINGERPRINTS FOR IDENTIFICATION OF PATÉ POULTRY SPECIES
- Name and Address of Corresponding Author: JORGE H. CALVO  
LABORATORIO DE GENÉTICA BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE VETERINARIA, c/MIGUEL SERVET 177  
50013 ZARAGOZA, SPAIN  
Telephone Number: 34 976 761619/ FAX Number: 34 976 761612  
e-mail: jbcervo@posta.unizar.es
- Style: I (we) affirm that the manuscript has been prepared in accordance with *Poultry Science* Instructions for Contributors (*Poultry Sci.* 79:139-146).
- I (we) have read the manuscript and I (we) hereby affirm that the content of this manuscript or a major portion thereof has not been published in a refereed journal, and it is not being submitted for publication elsewhere.
- Type of Manuscript (check one):  
 Full-length paper  
 Research note  
 Symposium paper  
Name of Symposium \_\_\_\_\_
- Scientific Section (check one):  
 Breeding and Genetics  
 Environment and Health  
 Metabolism and Nutrition  
 Physiology and Reproduction  
 Education and Production  
 Immunology and Molecular Biology  
 Processing and Products
- Processing Fee (check one):  
Check, purchase order or credit card payment MUST ACCOMPANY manuscript at time of submission.  
 Check  Purchase Order  Credit Card  
MasterCard  Visa  American Express Accepted  
Expiration Date 10/00  
Signature J. H. Calvo
- Publication Costs: The current charge for publication is \$66 per printed page in the journal for articles if at least one author is a member of PSA. If no authors are PSA members, the publication charge is \$85 per journal page. There is a charge for all reprints. A Reprint Order Form will be sent to the corresponding author with the author proof. The following agency or individual will be responsible for publication costs:  
Name: J. H. CALVO  
Address: Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria  
50013-Zaragoza, SPAIN.
- Permission to Republish (check one):  
Figures, tables, or other parts of the manuscript that have previously appeared in print or are not the property of the authors must be properly acknowledged in the manuscript. Permission to republish these items must be obtained from the person or institution holding the copyright, usually the publisher.  
 I (we) affirm that the material furnished for the journal has not been published previously elsewhere.  
 I (we) guarantee that if it has been previously published, in whole or part, permission has been obtained from author(s) and publisher for reproduction in the journal, and the authors have submitted copy for the credit lines with the manuscript. (Please attach permissions to this form.)
- Author Proofs: The corresponding author will be given an opportunity to read and correct the edited manuscript as page proofs, and a pink author approval form must be signed. Failure to return the corrected author proof and the author approval form to the Technical Editor by the deadline specified will delay publication of the article.
- Copyright Release: Copyright laws make it necessary for the Association to obtain a release from authors for all materials published. To



Scientific Section: Processing and Products

RESEARCH NOTE

**Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints for Identification of Pâté Poultry Species.**

J.H. CALVO<sup>1</sup>, P., ZARAGOZA, R. OSTA.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (phone 34 976 761619, Fax 34976 761612, email [jhcalvo@posta.unizar.es](mailto:jhcalvo@posta.unizar.es)).

ABSTRACT: A new procedure was developed and evaluated to detect pâté species composition by randomly amplified polymorphic DNA. Nowadays, some fraudulent or unintentional mislabeling exists that can be undetected, resulting in a lower quality of the product. On the other hand, some population groups such as vegetarians, Jewish and Arabics do not desire to eat pork.

This situation has prompted research to find a new method for the detection of pâté species composition. The randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method was used to generate fingerprint patterns for pig, chicken, duck, turkey and goose. 10 DNA samples from pig, chicken, turkey and duck were tested to confirm the effectiveness and the specificity of RAPDs method obtaining specific results for each species. Sensitivity of the method was studied by DNA dilution in each specie, detecting an amount of DNA up to 250 pg. Isolation of DNA from 30 pâtés (tinned and untinned) was carried out, obtaining an optimal DNA to use as template DNA in PCR. RAPD-PCR pattern was useful to identify pâté species composition in pork, duck, duck-pork, goose and poultry pâtés. This study demonstrates the usefulness of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting to distinguish among species in pâtés.

*(Key words: DNA fingerprints, poultry, pig, pâtés, authentication)*

## INTRODUCTION

The problem of substitution or adulteration of good quality high-priced pâtés, whether by accident or intention, is not a new one. Determining pâté species is an integral part of food regulatory control with respect to economic fraudulence. Apart from possible economic loss, correct species identification is important for the consumer for other reasons such as medical requirements of individuals who may have specific food allergies or religious restrictions (Jewish and Arabics). This situation has prompted research to find methods for the detection of the origin of pâtés.

Numerous analytical methods, which rely on proteins analysis have been used for pork and poultry identification such as electrophoresis techniques (Kim and Shelef, 1986; Skarpeid *et al.*, 1998), liquid chromatography (Ashoor *et al.*, 1998) and immunoassays (Jones *et al.*, 1985; Hsieh *et al.*, 1998). However, proteins lose their biological activity after animal death, and their presence and characteristics depend on the cell types. Furthermore, most of them are heat labile. Thus, for species identification, a DNA rather than protein analysis would be preferable.

Dot-blot technique was the first genetic approach for determination of species identity (Wintero *et al.*, 1990; Ebbehøj y Thomsen, 1991). At present, however, PCR is the technique of choice for species identification. Some PCR approaches are RAPD-PCR (Lee and Chang,

1994), DNA mitochondrial D-loop analysis (Murray *et al.*, 1995) and RFLPs analysis of different PCR fragments (Borgo *et al.*, 1996). Identification of poultry has been carried out in meat samples by different authors (Meyer *et al.*, 1995, Chikuni *et al.*, 1990). Up to now, no approaches in pâtés species identification have been performed. Since our purpose was the identification of pâté species, a method for poultry pâtés identification is presented on the basis of RAPD-PCR, which can be applied to the detection of fraudulent or ununintentional mislabeling of this species.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Sample Selection and DNA Extraction***

In order to test the specificity of the technique, 10 unrelated blood and muscle samples of chicken, duck, turkey and pig were analysed (10 of each one). Genomic DNA from blood was extracted according to a previously described procedure (Lahiri *et al.*, 1992). Genomic DNA from muscle was extracted according to a previously described procedure (Sambrook *et al.*, 1989).

Furthermore, 30 different pâtés (10 pork, 10 duck, 6 duck-pork, 3 goose, 1 poultry) were analysed. Genomic DNA was extracted according to a previously described procedure (Sambrook *et al.*, 1989).

### **DNA Fingerprinting and Gel Electrophoresis**

The set of primers used for RAPDs amplification were designed as follows: AGGACGCCTTCCGATACATG (forward primer) and CAGAAGGTCTTGGAGATGGC (reverse primer).

Double-stranded amplifications were carried out in a final volume of 50 $\mu$ l, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 15 pmol of each primer, 50 ng of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Thirty-five cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94°C for 1 minute, primer annealing at 47°C for 1 minute, and primer extension at 72°C for 1 minute. The last extension step was 5 minutes longer. An initial denaturation at 94°C for 4 minutes was performed to improve the final result. Electrophoresis of a 10 $\mu$ l portion of the amplification was carried out for 45 min at 100 V in a 3% agarose gel, containing ethidium bromide (1 $\mu$ g/ml) in TBE buffer. DNA fragment was visualized by UV transillumination and was photographed with type 55 Polaroid film (Polaroid Corp., Cambridge, MA).

### **Sensitivity**

Samples containing 2500, 250, 100, 50, 25, 10 and 5 pg/ $\mu$ l chicken, duck, turkey and pig DNA by dilution were taken. For this purpose, a PCR was carried out in a final volume of 25 $\mu$ l, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8,

2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 15 pmol of each primer, 25 ng of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The primers used were described in Fingerprint and Electrophoresis section. The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler in a final volume of 25µl, containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% triton X-100, 0.2 mM each of dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 20 pmol of each primer, 1 µl of template DNA and 2U of Taq polymerase (Promega). The DNA was amplified in a Biometra Thermal cycler. Thirty cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 94°C for 1 minute, primer annealing at 47°C for 1 minute, and primer extension at 72°C for 1 minute. The last extension step was 5 minutes longer. An initial denaturation at 94°C was performed for 4 minutes to improve the final result. Electrophoresis of a 10µl portion of the amplification was carried out for 45 min at 100 V in a 3% agarose gel, containing ethidium bromide (1µg/ml) in TBE buffer. DNA fragment was visualized by UV transillumination and was photographed with type 55 Polaroid film (Polaroid Corp., Cambridge, MA).

## RESULTS AND DISCUSSION

RAPD profiles were analysed *de visu*. The obtained fingerprint patterns were reproducible within the particular species under the same controlled

conditions. Reproducibility was checked by subjecting 10 non-related animals from each specie to the same PCR and electrophoresis conditions. Primers used showed good and specific fingerprint patterns for each specie studied (Figure 1). With these patterns we could discriminate between the five species. No amplifications were obtained from goose samples.

In order to verify the sensitivity of the method several DNA dilutions were made. It was possible to detect up to 250 pg of DNA in the species studied. This quantity of DNA corresponded to 1/1000 dilution of DNA.

For identification of pâté specie composition, PCR amplifications were carried out in several pâtés (tinned and untinned). Extraction of DNA from pâtés and other food matrices for subsequent use in PCRs is often considered to be a problem (Rossen *et al.*, 1992). Our work has shown that DNA extracted from pâté, by the method described, can be successfully used as template DNA in PCR. Fingerprints from duck, pork, goose and chicken showed the same DNA fingerprint patterns as those described for blood and muscle samples. Anyband in goose pâtés it would be considered as a fraud because no amplification was observed in 100% goose pâtés. Pork pâtés showed the specific band amplified in duck and other inespecific bands (Figure 2). Then, duck pâtés showed one band, but duck-pork pâtés showed the duck specific band and the other inespecific bands amplified in pork. In our work, in pâtés labelled as

having only duck pork was detected (Figure 3). Good quality high priced duck pâtés did not present pork as component. However, low quality duck pâtés, included pork or chicken which had not been specified in the label (Figure 3). Chicken and duck profile was found in the poultry pâté. To make the species composition identification easy, pig, duck and poultry known samples profiles can run together with the pâté samples from the unknown species.

Thus, by using PCR-RAPD for species identification is likely to be used as rapid and qualitative method in pâté speciation. However, further research would be needed in order to develop a quantitative method since this simple PCR analysis is only qualitative. In conclusion, results of this study clearly demonstrate the capability of RAPD fingerprint to distinguish pâtés mixtures with a simple PCR. This is a cheaper method than others based on RFLPs-PCR (which requires further digestions), ELISA or other techniques which need expensive equipment.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank M. Jaime for the revision of the English version. J.H. Calvo was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97). Research supported by project UZ210-47.

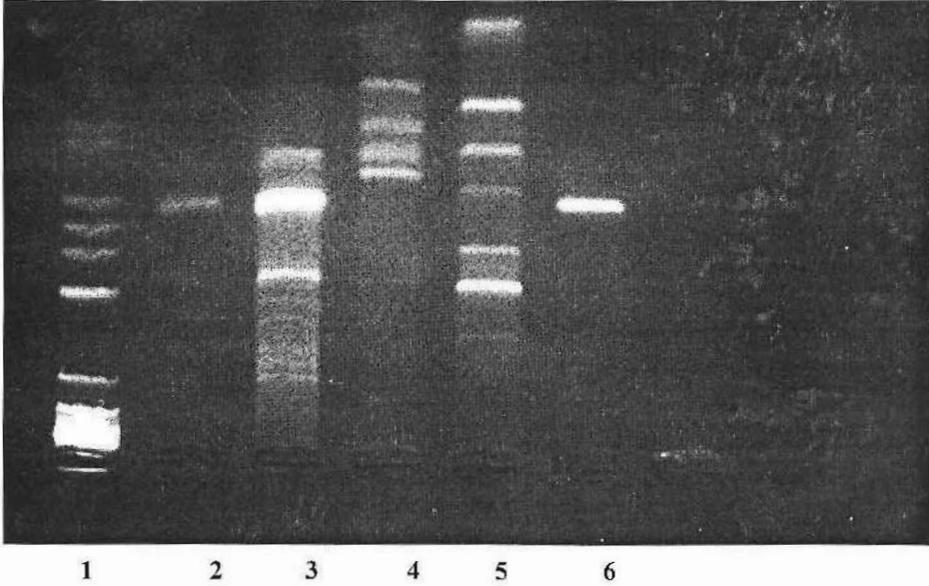
**REFERENCES**

- Ashoor, S.H., W.C. Montenand P.G. Stiles, 1998. Liquid chromatographic identification of meats. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(2): 397-403.
- Borgo, R., C. Soulie-Crosset, D. Bouchon and L. Gomot, 1996. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food Sci.* 61: 1-4.
- Chikuni, K., T. Tabata, M. Kosugiyama and M. Monma, 1994. Polymerase chain reaction for detection of sheep and goat meats. *Meat Science* 37: 337-345.
- Ebbehoj, K.F. and P.D. Thomsen, 1991. Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridation. *Meat Sci.* 30: 359-366.
- Hsieh, Y.H., S.C. Sheu and R.C. Bridgman, 1998. Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *J. Food Prot.* 61 (4): 476-481.
- Jones, S.L. and R.L.S. Patterson, 1985. Double antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.* 15: 1-13.
- Kim, H. and L.A. Shelef, 1986. Characterization and identification of raw beef, pork, chicken and turkey meats by electrophoretic patterns of their sarcoplasmis proteins. *J. Food Sci.* 51:731-741.

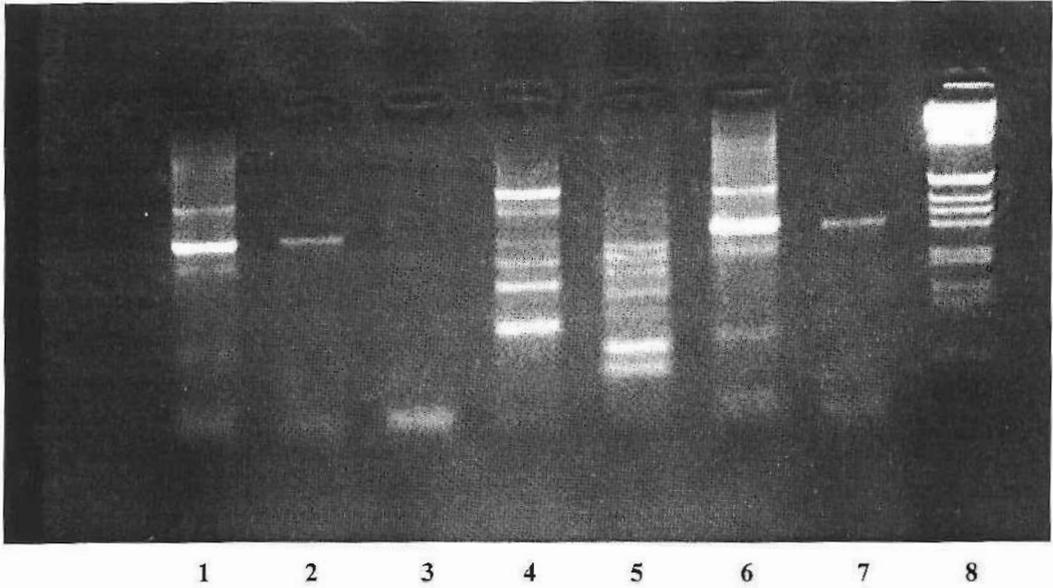
- Lahiri, D.K., S. Bye, J.I. Nurnberger Jr, M.E. Hodes and M. Crisp, 1992. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic ADN from whole blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Methods* 25 (4): 193-202.
- Lee, J.C. and J.G. Chang, 1994. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.* 67(2): 103-107.
- Meyer, R., C. Hofelein, J. Luthy and U. Candrian, 1995. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple method for Species Identification in Food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 78(6): 1542-1551.
- Murray, B.W., R.A. McClymont and C. Strobeck, 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J. Forensic Sci.* 40(6): 943-951.
- Rossen, L., K. Norskov, K. Holmstrom and O.F. Rasmussen, 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extractions solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17: 37-45.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Skarpeid, H.J., K. Kvaal and K.I. Hildrum, 1998. Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectricfocusing protein profiles. *Electrophoresis* 19(18): 3103-3109.

Wintero, A.K., P.D Thomsen. and W. Davies, 1991. A comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immuno-electrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Sci.* 27: 75-85.

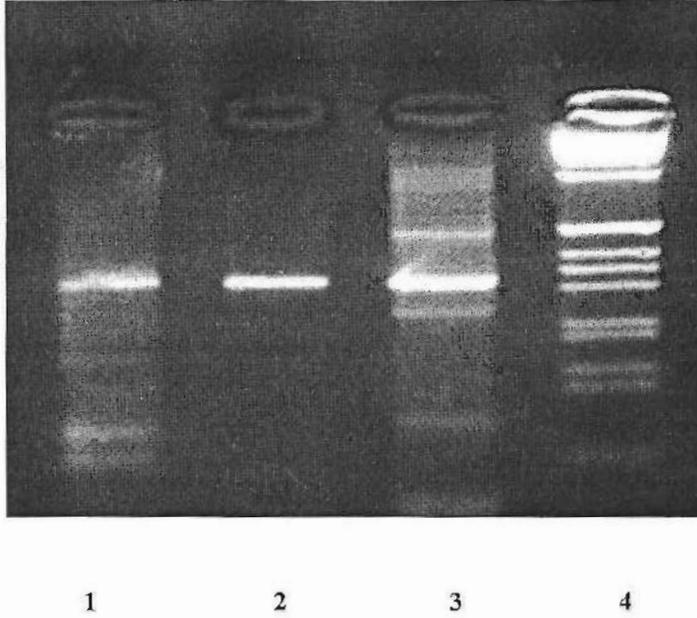
**FIGURE 1.** Results of RAPD-PCR fingerprinting from blood and muscle samples. Line 1: 1Kb marker (Gibco), line 2: duck, line 3: pig, line 4: chicken, line 5: turkey, line 6: duck, line 7: goose.



**FIGURE 2.** Results of RAPD-PCR fingerprinting from pâtés. Line 1: pig-duck, line2: duck, line 3: goose, line 4: turkey, line 5: chicken, line 6: pig, line7: duck, line 8: Brl 1Kb (Gibco).



**FIGURE 3.** Results of RAPD-PCR fingerprinting from fraudulent pâtés. Line 1: duck (chicken and duck profile were detected in this pâté), line2: duck, line 3: duck (pork and duck profile were detected in this pâté), line 4: BRL 1Kb (Gibco).



**4.2. MANUSCRITOS SOBRE EL  
APARTADO DE CANTIDAD Y CALIDAD  
INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS.**



**MANUSCRITO 7: Assignment\* of acetyl- coenzyme A carboxylase  $\alpha$  (ACACA) to pig chromosome 12 by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping (Artículo 5).**



---

Ms Judith Hartz, 11:40 4/08/00, CCG MS#5812 in MIME

---

X-Sender: hartz@mailserver.aecom.yu.edu  
Date: Fri, 04 Aug 2000 11:40:53  
To: jhcalvo@posta.unizar.es  
From: Ms Judith Hartz <hartz@aecom.yu.edu>  
Subject: CCG MS#5812 in MIME

August 4, 2000

Jorge H. Calvo  
Laboratorio de Genética Bioquímica  
Facultad de Veterinaria  
c/ Miguel Servet  
50013 Zaragoza, Spain

Re: Manuscript entitled "Assignment of acetyl- coenzyme A carboxylase  
a  
(ACACA) to pig chromosome 12 (12p13@p12) by fluorescence in situ  
hybridization and confirmation by genetic mapping," CCG MS # 5812

Dear Dr. Calvo:

The attachment 5812.doc is a galley proof of your manuscript edited  
for  
publication in Cytogenetics and Cell Genetics. A reprint order form is  
also  
attached. Both files are in Word for Windows 6.0. Please print out the  
galley proof and reprint order form. You may e-mail me any corrections  
but  
please send a hard copy of the galley proof with corrections marked  
and  
also a hard copy of the reprint order form. Please do so within 48  
hours.

Your Fig. 1 will be reduced to 88mm for publication.

Please check and return the corrected proof and reprint order form to  
me  
within 48 hours.

Sincerely yours,

Judith Hartz  
Managing Editor  
Cytogenetics Cell Genetics  
Department of Molecular Genetics  
Albert Einstein College of Medicine  
1300 Morris Park Ave  
Bronx, NY 10461



## Assignment\* of acetyl-coenzyme A carboxylase $\alpha$ (ACACA) to pig chromosome 12 (12p12-p13) by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping.

J. H. Calvo,<sup>a</sup> N.L. Lopez-Corrales,<sup>b</sup> S.I. Anderson,<sup>b</sup> T.M. Skinner,<sup>b</sup> S. Marcos,<sup>a</sup> R. Osta,<sup>a</sup> A.L. Archibald<sup>b</sup> and P. Zaragoza<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, c/Miguel Servet 177, Zaragoza, SPAIN

<sup>b</sup>Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian, Scotland, UK

\*To our knowledge this is the first time this gene has been mapped.

### Rationale and significance

Acetyl-coenzyme A carboxylase  $\alpha$  catalyzes the carboxylation of acetyl-CoA to form malonyl-Coa, which is the rate limiting and committed step in de novo fatty acid biosynthesis. The *ACACA* gene has been cloned and sequenced in several species such as rat (Lopez-Casillas et al., 1988), chicken (Takay et al., 1988), sheep (Barber and Travers, 1995) and human (Ha et al., 1994). Whereas, the pig *ACACA* gene remains unassigned human *ACACA* has been located to human (HSA) chromosome 17 (17q12) (Abu-Elheiga et al., 1995).

We report the localization of the pig *ACACA* gene to porcine (SSC) chromosome 12p12-13 by fluorescent in situ hybridization and linkage analysis.

### Materials and methods

**Isolation of specific pig *ACACA* fragment.** Two primers designed from ovine *ACACA* sequence were used to amplify a 253 b.p. fragment of the porcine *ACACA* gene:

5'-CTCTGAGGGCTCGTTTTGAAG-3'

5'-CTCATGTGTAAGGCCAAACCAT-3'

PCR amplification was performed using 25 ng of DNA from a Large White pig. Cycling conditions were 94°C for 30s, 52°C for 30s and 72°C for 30s for 30 cycles. PCR products were cloned and sequenced. Homology searches were performed with BLAST programs at National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

The porcine sequence showed a high degree of identity with *ACACA* sequences from other species, and with human *ACACA* exon 5 (Ha et al., 1994). The sequenced PCR product was used to design two pig-specific primers.

**Isolation of large fragment genomic clone for *ACACA*.** A BAC clone containing the pig *ACACA* gene was identified by PCR screening of the PigE BAC library (Anderson et al., in press), using the pig-specific primers. Partial sequence analysis of the BAC clone (185P04) confirmed the presence of *ACACA* exon 5 sequences (EMBL: AF252267).

**Fluorescence in situ hybridization (FISH).** FISH was carried out essentially as described previously by Lichter et al. (1990), using chromosome spreads from 2-3 unrelated adult pigs. FISH experiments were carried out twice, using duplicate slides. Around a total 40 R-banded metaphases were scored for FISH signals in each experiment. Pig R-banded chromosomes were obtained according to the method of Lemiux et al. (1992). BAC DNA from the *ACACA* clone (PigE BAC 185N11) was labeled with biotin by nick-translation procedures using a BioNick kit (GIBCO) and purified on Sephadex columns (Sprime-3prime). Hybridization signals were detected

with FITC-avidin (Boehringer Mannheim) and chromosomes were counter stained with propidium iodide (Sigma) and PPD11 (Sigma) as antifade solution.

Probe name(s): 185P04 from the PigE BAC library.

Probe type: Genomic DNA

Vector: pBelo BAC11.

Insert size: 150 Kb.

Proof of authenticity: DNA sequencing.

Gene reference: AF252267

**Linkage mapping.** We developed a microsatellite marker (*S0604*) from the 185P04 BAC clone following screening of subclones by Southern hybridization using (CA)<sub>25</sub> as a probe, and subsequent partial sequencing. The microsatellite contains a (CA)<sub>15</sub> repeat (AF252269). The following primer pairs, flanking the repeats, were used to genotype the PiGMap reference pedigrees (Archibald et al., 1995):

5'-TCAGTCGCCGAGATATAGA-3'

5'-ACTTCCCAGGGCTTCTGTTT-3'

Two point linkage analyses were performed using the CRI-MAP program (Green et al., 1990).

### Results

Mapping data: 12

Most precise location: 12p12-13

Na. of cells examined: 80

Number of cells with specific signal:

1 ( 0 ), 2 ( 13 ), 3 ( 7 ), 4 ( 52 ) chromatids per cell

Location of background signals: none observed

**Mapping by linkage analysis:**

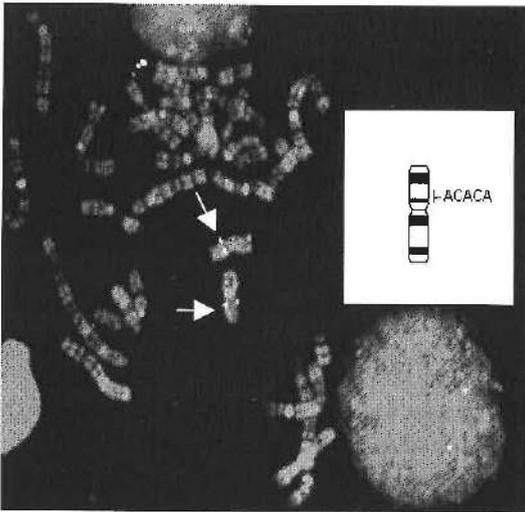
Significant linkage of *S0604* and hence *ACACA* was observed with - *ALOX12* (0.35, 0.12; Lod 4.88); *S0090* (0.16, 0.03; Lod 9.76); *S0601* (0.47, 0.06; Lod 4.05); *SW957* (0.49, 0.25; Lod 3.41). Female-specific, male-specific recombination fractions and LOD scores respectively are shown in parenthesis.

Location: Chromosome 12

Number of animals typed: 96.

Most likely gene order: *SO143*-(34.8 cM)-*PRKAR1A*-(2.5 cM)-*SW957*-(1.7 cM)-*GHI*-(40.2)-*SO090*-(7.4 cM)-*SO604/ACACA*-(11.4 cM)-*SO147*-(26.1 cM)-*SO601*-(4.9 cM)-*ALOX12*

**Figure 1** Chromosomal mapping of *ACACA* by FISH. The arrows indicate the site of specific hybridization to chromosome 12 at the location corresponding to 12p12-13.



The results of the FISH and linkage analyses confirm the assignment of porcine *ACACA* to SSC12 which is consistent with comparative mapping information as human *ACACA* maps to HSA17 which has extensive homology with SSC12.

Archibald AL, Haley CS, Brown JF, Couperwhite S, McQueen HA, Nicholson D, Coppeters W, Van de Weghe A, Stratil A, Winterø AK, Fredholm M, Larsen NJ, Nielsen VH, Milan D, Woloszyn N, Robic A, Dalens M, Riquet J, Gellin J, Caritez J-C, Burgaud G, Ollivier L, Bidanel J-P, Vaiman M, Renard C, Geldermann H, Davoli R, Ruyter D, Verstege EJM, Groenen MAM, Davies W, Hoyheim B, Keiserud A, Andersson L, Ellegren H, Johansson M, Marklund L, Miller JR, Anderson Dear DV, Signer E, Jeffreys AJ, Moran C, Le Tissier P, Muladno, Rothschild MF, Tuggle CK, Vaske D, Helin J, Liu H-C, Rahman A, Yu T-P, Larson RG, Schnitz CB: The PigMap consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammal Genome* 6:157-175 (1995)

Barber MC, Travers MT: Cloning and characterisation of multiple acetyl-CoA carboxylase transcripts in ovine adipose tissue. *Gene* 145(2): 271-275 (1995).

Green P, Falls K, Crooks S: Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO (1990).

Ha J, Daniel S, Kong IS, Park CK, Tae HJ, Kim KH: Cloning of human acetyl-CoA carboxylase cDNA. *Eur J Biochem* 219:297-306 (1994).

Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot, E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization in small single copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59 (4): 311-312 (1992).

Litcher P, Tang CC, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC: High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 237: 64-69 (1990).

Lopez-Casillas F, Bai DH, Luo XC, Kong IS, Herndonson MA, Kim KH: Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl coenzyme A carboxylase. *Proc Natl Acad Sci* 85: 5784-5788 (1988).

Takay T, Yokoyama C, Wada K, Tanabe T: Primary structure of chicken liver acetyl-CoA carboxylase deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem* 263(6): 2651-2657 (1988).

Grant support or other acknowledgements: S.I.A., N.L.L.-C., and A.L.A. were supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. J.H.C. was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97). R.O., C.R. and P.Z. were supported by project UZ210-47.

Received ; manuscript accepted  
(Above dates will be entered by the editors.)

Request reprints from Jorge H. Calvo, Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, c/ Miguel Servet, 50013 Zaragoza, Spain. Ph 34976761619. Fax 34976761612. Email jhcalvo@posta.unizar.es.

#### References

- Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ: Human acetyl-CoA carboxylase: Characterization, molecular cloning and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci* 92: 4011-4015 (1995).
- Anderson SI, Lopez-Corrales NL, Gorick B, Archibald AL: A large fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mammal Genome* (in press)

## Anexo 7: Acetil-CoA carboxilasa.

## Secuencia exon 5 ACACA. Genbank report.

 1: GI = "8809848" [GenBank] Sus scrofa acetyl-CoA carbo... Protein, ]

```

LOCUS       AF252267       253 bp    DNA        MAM        29-JUN-2000
DEFINITION  Sus scrofa acetyl-CoA carboxylase alpha (ACACA) gene,
              exon 5 and partial cds.
ACCESSION   AF252267
VERSION     AF252267.1  GI:8809848
KEYWORDS    .
SOURCE      pig.
  ORGANISM  Sus scrofa
              Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
              Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;
              Suina; Suidae; Sus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 253)
  AUTHORS   Calvo, J.H., Lopez-Corrales, N.L., Osta, R.,
              Anderson, S.I., Zaragoza, P. and Archibald, A.L.
  TITLE     Assignment of acetyl-coenzyme A carboxylase alpha
              (ACACA) to pig chromosome 12 by in situ hybridization
              and confirmation by genetic mapping
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 253)
  AUTHORS   Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (03-APR-2000) Laboratorio de Genetica
              Bioquimica, Facultad de Veterinaria, Universidad de
              Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..253
                       /organism="Sus scrofa"
                       /db_xref="taxon:9823"
                       /chromosome="12"
     gene             <1..>253
                       /gene="ACACA"
     exon             <27..>253
                       /gene="ACACA"
                       /number=5
     mRNA             <27..>253
                       /gene="ACACA"
                       /product="acetyl-CoA carboxylase alpha"
     CDS              27..>253
                       /gene="ACACA"
                       /codon_start=1
                       /product="acetyl-CoA carboxylase alpha"
                       /protein_id="AAF79957.1"
                       /db_xref="GI:8809849"

                       /translation="MDEPSPLAKPLELNQHSRFIIGSVSEDNSEDE

```

ISNLVKLDLLEEKEGSLSPASVSSDTLSDLGISSLQDGLALHM"

BASE COUNT            58 a            59 c            69 g            67 t

ORIGIN

1 ctctgagggc tcgttttgaa ggaataatgg atgaaccgtc tcccttgget  
aaacctctgg

61 agttgaacca gcactccgcg ttcataattg gttctgtgtc tgaagataac  
tcagaggatg

121 agattagcaa cctggtgaag ctggacctgc tggaggagaa ggagggtctt  
ctgtaccag

181 cttctgtcag ctcagatagc ctctctgact tggggatctc tagcctacag  
gatggtttgg

241 ctttacacat gag//

### Secuencia microsatélite S0604. Genbank report.



1 : GI = "8809852" [GenBank]

Sus scrofa chromosome 12, s...

Taxonomy

LOCUS AF252269 196 bp DNA STS 29-JUN-2000

DEFINITION Sus scrofa chromosome 12, sequence tagged site.

ACCESSION AF252269

VERSION AF252269.1 GI:8809852

KEYWORDS STS.

SOURCE pig.

ORGANISM Sus scrofa  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
Suina; Suidae; Sus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 196)

AUTHORS Calvo, J.H., Lopez-Corrales, N.L., Osta, R.,  
Anderson, S.I., Zaragoza, P. and Archibald, A.L.

TITLE Assignment of acetyl-coenzyme A carboxylase alpha  
(ACACA) to pig chromosome 12 by in situ hybridization  
and confirmation by genetic mapping

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 196)

AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-APR-2000) Laboratorio de Genetica  
Bioquimic, Facultad de Veterinaria, Universidad de  
Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..196  
/organism="Sus scrofa"  
/db\_xref="taxon:9823"  
/chromosome="12"

repeat region 56..85  
/note="ACACA-related microsatellite"  
/rpt\_type=tandem  
/rpt\_unit=ca

BASE COUNT            74 a            50 c            26 g            46 t

ORIGIN

1 tcagtcgcoo gagatataga aaagttactt taattgctga ottacatcct  
aaatacacac

61 acacacacac acacacacac acacagtctg cagaggtact cctatcatca  
actaacaagg

121 agttcaaagt totacaccaa tcaatottct attatcatta ttacagacat  
taacgaaaac

181 agaagcctg ggaagt//

**Figura 17.** En la figura se observa la digestión de los BAC que contienen la ACACA y la MGAM con las enzimas Hae III, AluI, PstI, BamHI, HindIII. Línea 1: BAC ACACA Hae III, línea 2: BAC ACACA AluI, línea 3: BAC ACACA PstI, línea 4: BAC ACACA BamHI, línea 5: BAC ACACA Hind III, línea 6: fago lambda digerido con HindIII, línea 7: BAC MGAM Hae III, línea 8: BAC MGAM AluI, línea 9: BAC MGAM PstI, línea 10: BAC MGAM BamHI, línea 11: BAC MGAM Hind III, línea 12: 1Kb Gibco marker. Entre ellos se situa el. En la parte inferior se ve en que fragmentos digeridos hibridan la sonda (CA)<sub>25</sub> marcada con radioactividad y que por lo tanto contienen microsátélites.

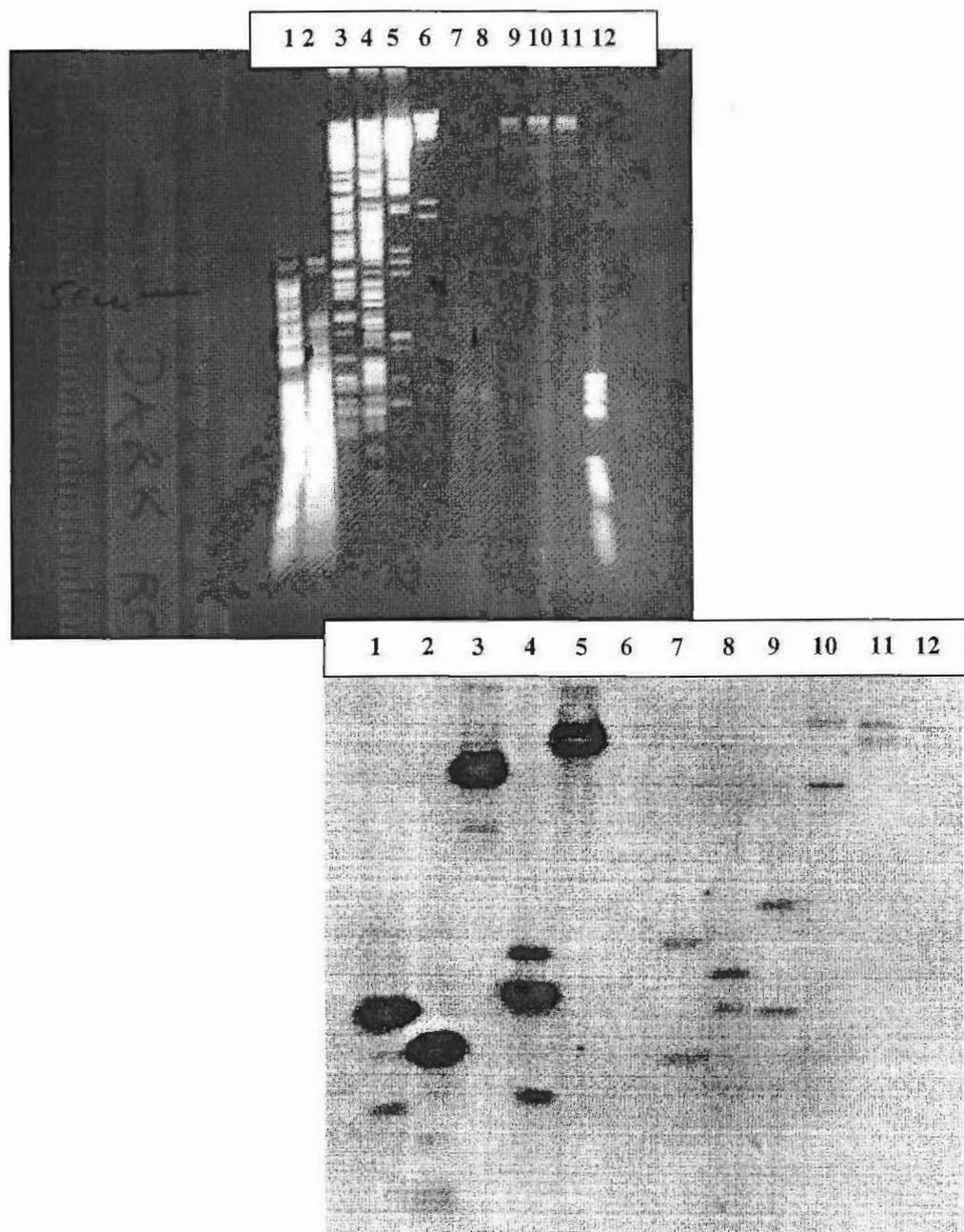
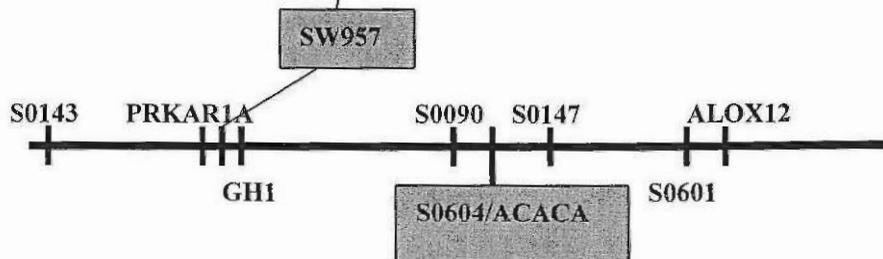
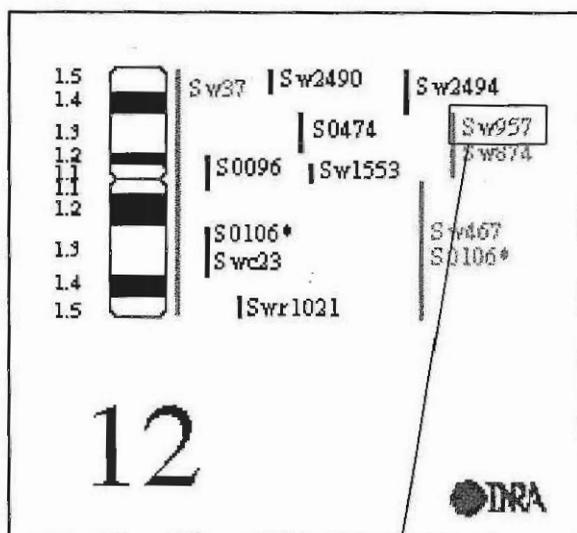
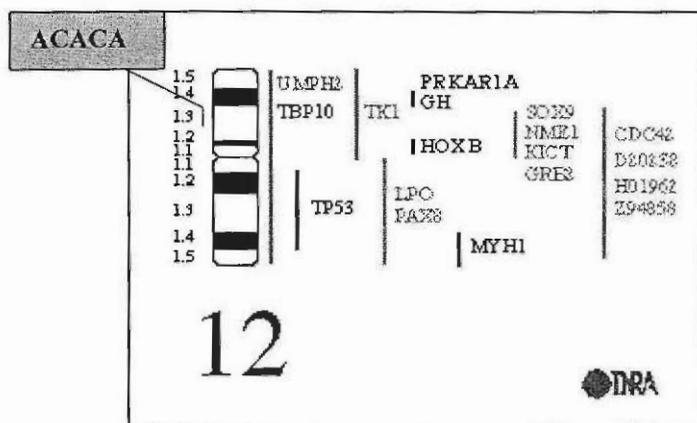


Figura 18. Actual situación del SSC12.





**MANUSCRITO 8: Assignment\* of maltase glucoamylase (MGAM) to pig chromosome 2 by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping (Artículo 6).**



---

Ms Judith Hartz, 11:43 4/08/00, CCG MS#5813 in MIME

---

X-Sender: hartz@mailserver.aecom.yu.edu  
Date: Fri, 04 Aug 2000 11:43:30  
To: jhcalvo@posta.unizar.es  
From: Ms Judith Hartz <hartz@aecom.yu.edu>  
Subject: CCG MS#5813 in MIME

August 4, 2000

Jorge H. Calvo  
Laboratorio de Genética Bioquímica  
Facultad de Veterinaria  
c/ Miguel Servet  
50013 Zaragoza, Spain

Re: Manuscript entitled "Assignment of maltase glucoamylase (MGAM) to pig chromosome 2 (2q21) by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping," CCG MS # 5813

Dear Dr. Calvo:

The attachment 5813.doc is a galley proof of your manuscript edited for publication in Cytogenetics and Cell Genetics. A reprint order form is also attached. Both files are in Word for Windows 6.0. Please print out the galley proof and reprint order form. You may e-mail me any corrections but please send a hard copy of the galley proof with corrections marked and also a hard copy of the reprint order form. Please do so within 48 hours.

Your Fig. 1 will be reduced to 88mm for publication.

Please check and return the corrected proof and reprint order form to me within 48 hours.

Sincerely yours,

Judith Hartz  
Managing Editor  
Cytogenetics Cell Genetics  
Department of Molecular Genetics  
Albert Einstein College of Medicine  
1300 Morris Park Ave

---

Printed for "Jorge H. Calvo" <jhcalvo@posta.unizar.es>

1



## Assignment\* of maltase glucoamylase (*MGAM*) to pig chromosome 2 (2q21) by fluorescence in situ hybridization and confirmation by genetic mapping.

J. H. Caivo,<sup>a</sup> N.L. Lopez-Corrales,<sup>b</sup> R. Osta,<sup>a</sup> T.M. Skinner,<sup>b</sup> S.J. Anderson,<sup>b</sup> C. Rodellar, P. Zaragoza<sup>a</sup> and A.L. Archibald<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, c/Miguel Servet 177, Zaragoza, SPAIN

<sup>b</sup>Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian, Scotland, UK

\*To our knowledge this is the first time this gene has been mapped.

### Rationale and significance

Maltase glucoamylase, one of the major constituents of the intestinal microvillar membrane (Norén *et al.*, 1986), together with sucrase-isomaltase, has a role in the final digestion of starch. It has been hypothesized that human maltase glucoamylase activity serves as an alternative pathway for starch digestion when luminal alpha-amylase activity is reduced as a result of immaturity or malnutrition and that maltase glucoamylase plays a unique role in the digestion of malted dietary oligosaccharides (Nichols *et al.*, 1998). The human *MGAM* gene has been cloned and sequenced (Nichols *et al.*, 1998). The human *MGAM* has been located to human (HSA) chromosome 7 (Nichols *et al.*, 1998), but, as yet, the porcine *MGAM* gene has not been mapped.

We report the localization of the porcine *MGAM* gene to porcine (SSC) chromosome 2 by fluorescent in situ hybridization and linkage analysis. This assignment represents the first evidence of homology between SCC2 and HSA7.

### Materials and methods

**Isolation of specific pig *MGAM* fragment.** Two primers designed from human *MGAM* sequence were used to amplify a 108 b.p. fragment of the porcine *MGAM* gene:

5'-TAAGGAGATGTCAGCTGTG-3'

5'-AGGCATCCAATTCTTCTGGAG-3'

PCR amplification was performed using 25 ng of DNA from a Large White pig. Cycling conditions were 94°C for 30s, 52°C for 30s and 72°C for 30s for 30 cycles. The PCR products were cloned and sequenced. Homology searches were performed with BLAST programs at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

The porcine sequence showed a high degree of identity with human *MGAM* (Nichols *et al.*, 1998). The sequenced PCR product was used to design two pig-specific primers.

**Isolation of large fragment genomic clone for *MGAM*.** A BAC clone containing the pig *MGAM* gene was identified by PCR screening of the PigE BAC library (Anderson *et al.*, in press), using the pig-specific primers. Partial sequence analysis of the BAC clone (149N11) confirmed the presence of *MGAM* sequences (EMBL: AF252268).

**Fluorescence in situ hybridization (FISH).** FISH was carried out essentially as described previously by Lichter *et al.* (1990), using chromosome spreads from 2-3 unrelated adult pigs. FISH experiments were carried out twice, using duplicate slides. Around a total 40 R-banded metaphases were scored

for FISH signals in each experiment. Pig R-banded chromosomes were obtained according to the method of Lemieux *et al.* (1992). BAC DNA from the *MGAM* clone (PigE BAC 149N11) was labeled with biotin by nick-translation procedures using a BioNick kit (GIBCO) and purified on Sephadex columns (5prime-3prime). Hybridization signals were detected with FITC-avidin (Boehringer Mannheim) and chromosomes were counter stained with propidium iodide (Sigma) and PPD11 (Sigma) as antifade solution.

Probe name(s): 149N11 from the PigE BAC library.

Probe type: Genomic DNA

Vector: pBelo BAC11.

Insert size: 150 Kb.

Proof of authenticity: DNA sequencing.

Gene reference: AF252268

**Linkage mapping.** We developed a microsatellite marker (*S0605*) from the 149N11 BAC clone following screening of subclones by Southern hybridization using (CA)<sub>25</sub> as a probe, and subsequent partial sequencing. The microsatellite contains a (TC)<sub>12</sub> (AC)<sub>14</sub> compound repeat (AF252270). The following primer pairs, flanking the repeat site, were used to genotype the PiGMap reference pedigrees (Archibald *et al.*, 1995):

5'-TGTTCTGTGTCAGTTTGTCTGTC-3'

5'-GCATCGGGAACATATATCCAGTCA-3'

Two point linkage analyses were performed using the CRI-MAP program (Green *et al.*, 1990).

### Results

Mapping data: 2

Most precise location: 2q21

No. of cells examined: 80

Number of cells with specific signal:

1 ( 0 ), 2 ( 27 ), 3 ( 3 ), 4 ( 50 ) chromatids per cell

Location of background signals: none observed

Mapping by linkage analysis:

Significant linkage of *S0605* and hence *MGAM* was observed with - *FSHB* (0.13, 0.23; Lod 3.13); *PTH* (0.0, 0.26; Lod 3.67); *S0010* (0.0, 0.36; Lod 4.80); *SW395* (0.0, 0.08; Lod 8.46) and *SW776* (0.04, 0.09; Lod 9.06).

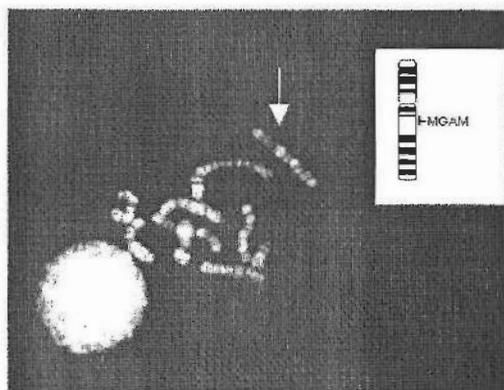
Female-specific, male-specific recombination fractions and LOD scores respectively are shown in parenthesis.

Location: Chromosome 2.

Number of animals typed: 96.

Most likely gene order: *SW256*-(7.0 cM)-*S01#1*-(17.8 cM)-*SW2#0*-(11.1 cM)-*F5HB*-(7.8 cM)-*PTH*-(3.9 cM)-*SW776*-(5.7 cM)-*S0605/MGAM*-(15.4 cM)-*S0226*-(3.4 cM)-*S0010*-(16.8 cM)-*HSD17B4*.

The human *MGAM* maps to HSA7. The known regions of the pig genome that share homology with HSA7 are SSC3p15-p17, SSC9q11-q21 and SSC18. Thus, the assignment of the porcine *MGAM* locus to SSC2 has revealed a new region of homology between HSA7 and SSC2.



**Figure 1** Chromosomal mapping of *MGAM* by FISH. The arrow indicates the site of specific hybridization to chromosome 2 at the location corresponding to q21.

Grant support or other acknowledgements: S.I.A., N.L.L.-C., and A.L.A. were supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. J.H.C. was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97). R.O., C.R. and P.Z. were supported by project UZ210-47.

Received ; manuscript accepted  
(Above dates will be entered by the editors.)

Request reprints from Jorge H. Calvo. Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, c/ Miguel Servet, 50013 Zaragoza, Spain. Ph 34976761619. Fax 34976761612. Email jhcalvo@posta.unizar.es.

## References

- Anderson SI, Lopez-Corrales NL, Gorick B, Archibald AL: A large fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mammal Genome* (in press)
- Archibald AL, Haley CS, Brown JF, Couperwhite S, McQueen HA, Nicholson D, Coppieters W, Van de Weghe A, Stratil A, Wintero AK, Fredholm M, Larsen NJ, Nielsen VH, Milan D, Woloszyn N, Robic A, Dalens M, Riquet J, Gellin J, Caritez J-C, Burgaud G, Ollivier L, Bidanel J-P, Vairman M, Renard C, Geldermann H, Davoli R, Ruyter D, Verstege EJM, Groenen MAM, Davies W, Høyheim B, Keiserud A, Andersson L, Ellegren H, Johansson M, Marklund L, Miller JR, Anderson Dear DV, Signer E, Jeffreys AJ, Moran C, Le Tissier P, Muladno, Rothschild MF, Tuggle CK, Vaske D, Helm J, Liu H-C, Rahman A, Yu T-P, Larson RG, Schmitz CB: The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammal Genome* 6:157-175 (1995)
- Green P, Falls K, Crooks S: Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO (1990).
- Lemüx, N, Dutrillaux, B y Viegas-Pequignot, E. A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization in small single copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 59 (4): 311-312 (1992).
- Litcher P, Tang CC, Call K, Hermansoh G, Evans GA, Housman D, Ward DC: High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 237: 64-69 (1990).
- Nichols B L, Eldering J, Hahn D, Quaroni A, Sterchi E: Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. Homology to sucrase-isomaltase. *J Biol Chem* 273(5): 3076-3081 (1998).
- Norén O, Sjöström H, Cowell G M, Tranum-Jensen J, Hansen O C, Welinder K G: Pig intestinal microvillar Maltase-glucoamylase. *J Biol Chem* 261(26): 12306-12309 (1986).

## Anexo 8: Maltasa-glucoamilasa.

## Secuencia MGAM. Genbank report.

 1 : GI = "8809850" [GenBank] Sus scrofa maltase glucoamy... Protein, 1

LOCUS AF252268 107 bp DNA MAM 29-JUN-2000  
 DEFINITION Sus scrofa maltase glucoamylase (MGAM) gene, partial cds.  
 ACCESSION AF252268  
 VERSION AF252268.1 GI:8809850  
 KEYWORDS .  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 107)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Lopez-Corrales, N.L., Anderson, S.I.,  
 Zaragoza, P., Osta, R. and Archibald, A.L.  
 TITLE Assignment of maltase glucoamylase (MGAM) to pig  
 chromosome 2 by in situ hybridization and confirmation  
 by genetic mapping  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 107)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (03-APR-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimic, Facultad de Veterinaria, Universidad de  
 Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..107  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 mRNA <1..>107  
 /gene="MGAM"  
 /product="maltase glucoamylase"  
 gene <1..>107  
 /gene="MGAM"  
 CDS <1..>107  
 /gene="MGAM"  
 /codon\_start=3  
 /product="maltase glucoamylase"  
 /protein\_id="AAF79958.1"  
 /db\_xref="GI:8809851"  
 /translation="ASNSSGVPHCYFVDELYSVSDVQYDSFGATADISL"  
 BASE COUNT 21 a 27 c 23 g 36 t  
 ORIGIN  
 1 aggcattcaa ttcttctgga gtccttcatt gctattttgt cgatgagctg  
 tactccgtca  
 61 gtgatgttca gtagactca tttggggcca cagctgacat ctcctta//

## Secuencia microsatélite S0605. Genbank report.



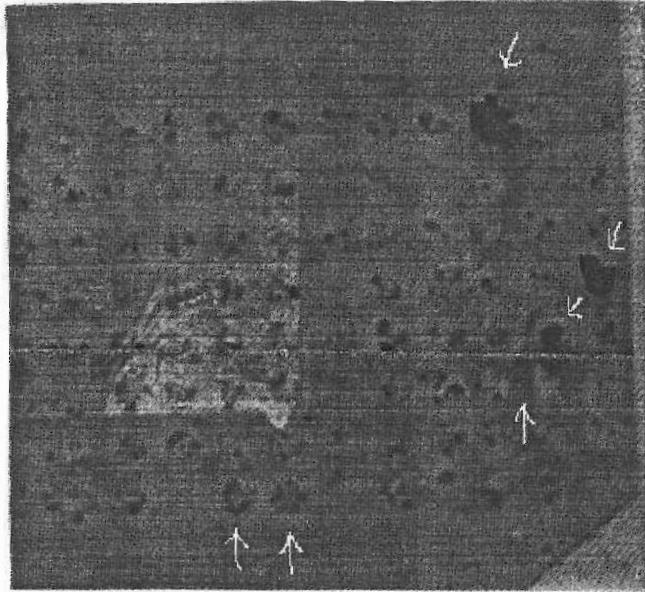
1 : GI = "8809853" [GenBank]

Sus scrofa chromosome 2, se...

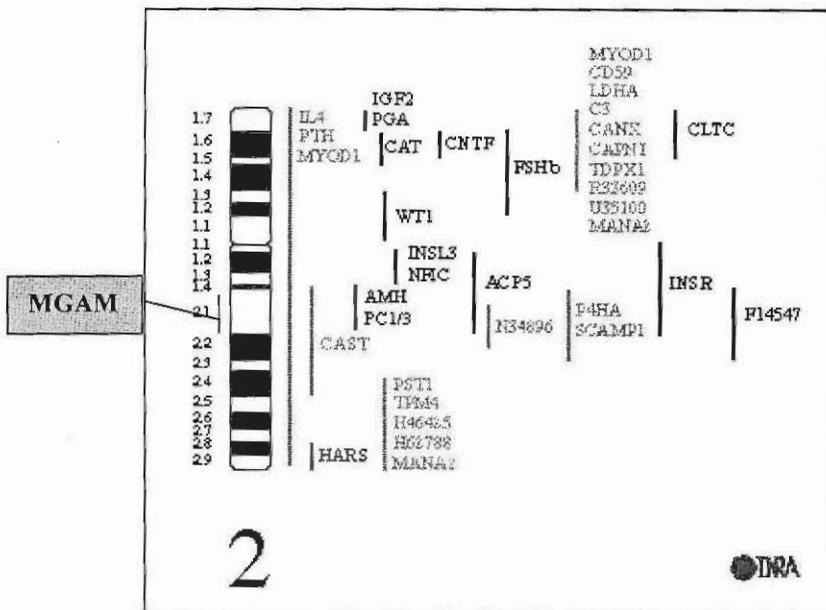
Taxonomy

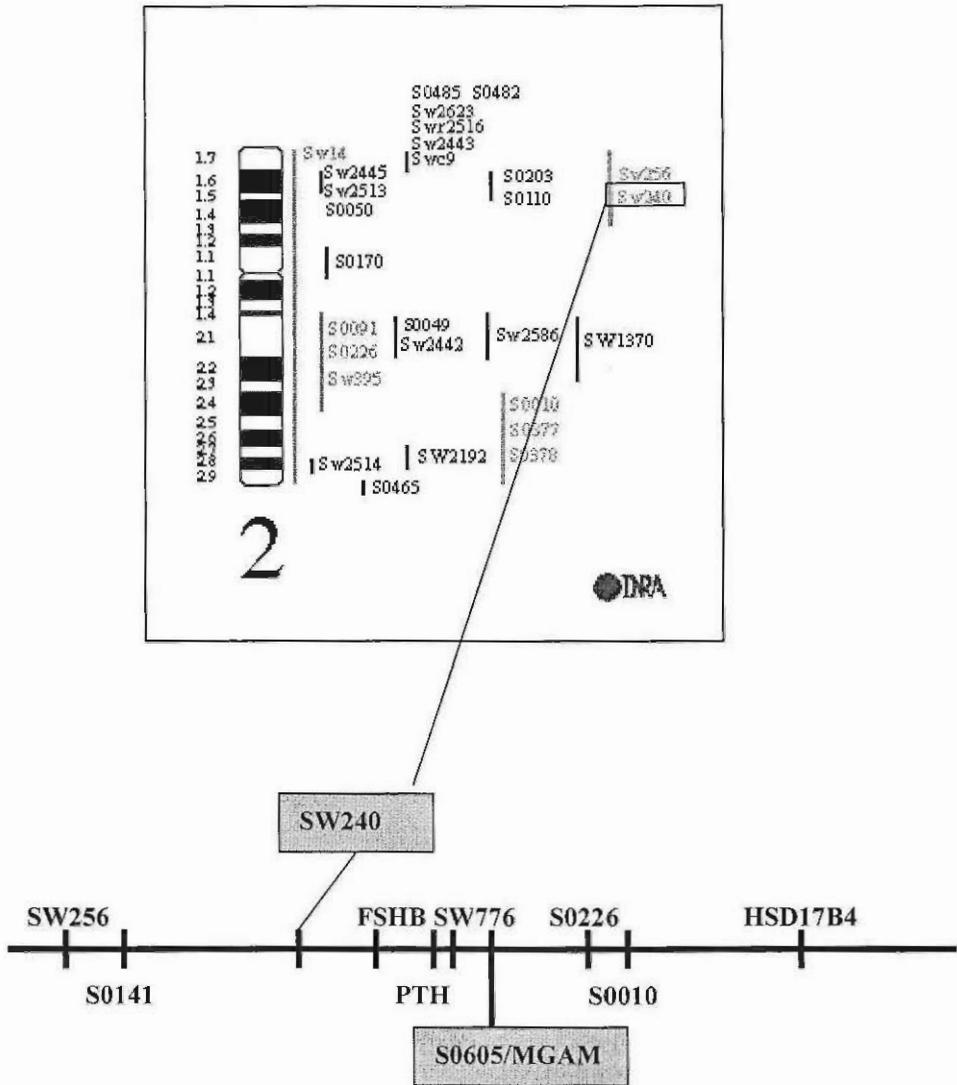
LOCUS AF252270 162 bp DNA STS 29-JUN-2000  
 DEFINITION Sus scrofa chromosome 2, sequence tagged site.  
 ACCESSION AF252270  
 VERSION AF252270.1 GI:8809853  
 KEYWORDS STS.  
 SOURCE pig.  
 ORGANISM Sus scrofa  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla;  
 Suina; Suidae; Sus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 162)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Lopez-Corrales, N.L., Anderson, S.I.,  
 Zaragoza, P., Osta, R. and Archibald, A.L.  
 TITLE Assignment of maltase glucoamylase (MGAM) to pig  
 chromosome 2 by in situ hybridization and confirmation  
 by genetic mapping  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 162)  
 AUTHORS Calvo, J.H., Osta, R. and Zaragoza, P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (03-APR-2000) Laboratorio de Genetica  
 Bioquimic, Facultad de Veterinaria, Universidad de  
 Zaragoza, Miguel Servet 177, Zaragoza 50010, Spain  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..162  
 /organism="Sus scrofa"  
 /db\_xref="taxon:9823"  
 /chromosome="2"  
repeat region 41..60  
 /note="MGAM-related microsatellite"  
 /rpt\_type=tandem  
 /rpt\_unit=ct  
repeat region 67..98  
 /note="MGAM-related microsatellite"  
 /rpt\_type=tandem  
 /rpt\_unit=ca  
 BASE COUNT 43 a 52 c 17 g 50 t  
 ORIGIN  
 1 tgttctgtca gtttctgtct ctacagcaaa gtgaccagct ctctctctct  
 ctctctctct  
 61 ataaaacaca cacacacaca cacacacaca cacacacatt ctttttctca  
 cattatctc  
 121 catcatgctt cattataagt gactggatat agttccagct gc//

**Figura 19.** En la figura se observa el segundo screening para aislar el fragmento del BAC que contiene el microsatélite. Este screening es el realizado sobre colonias bacterianas. Las flechas marcan los colonias bacterianas positivas.



**Figura 20.** Actual situación del SSC2.





**MANUSCRITO 9: ASSIGNMENT\* OF PPK98 (TRA1) TO PIG CHROMOSOME 5 BY FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION AND CONFIRMATION BY SOMATIC CELL HYBRID ANALYSIS. (ARTÍCULO 7).**



# Cytogenetics and Cell Genetics

From  
Thomas Haaf  
**Associate Editor**  
Max-Planck-Institute of  
Molecular Genetics  
Innestrasse 73  
D-14195 Berlin, Germany  
Tel. (49) 30 8413 1251  
Fax (49) 30 8413 1383  
E-mail: haaf@molgen.mpg.de

**Chief Editors**

Harold P. Klinger  
Michael Schmid

**Co-Editor-in-Chief**

Linda A. Cannizzaro

**Executive Editors**

Peter L. Pearson  
Thomas B. Shows

**Associate Editors**

Ad Geurts Van Kessel  
Thomas Haaf  
Anne Kallioneimi  
George Klein  
Julie Korenberg  
Peter Lichter  
Bernhard H.F. Weber

**Managing Editor**

Judith A. Hartz

**Editorial Administrator**

Barbara Grandinetti

Dr. Jorge H. Calvo  
Laboratorio de Genética Bioquímica  
Facultad de Veterinaria  
Miguel Servet 177  
50013 Zaragoza (Spain)

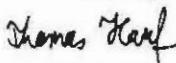
Re: CYTOGENETICS AND CELL GENETICS  
manuscript no. 5826

30. August 2000

Dear Dr. Calvo,

I am pleased to inform you that your revised manuscript entitled "*Assignment of ppk98 (TRA1) to pig chromosome 5 by fluorescent in situ hybridization and confirmation by somatic cell hybrid panel analysis*" has has been accepted for publication in CYTOGENETICS AND CELL GENETICS and forwarded to the Editorial office in New York.

Yours sincerely,



Dr. Thomas Haaf

**KARGER**

Medical and Scientific Publishers  
Basel · Freiburg · Paris · London · New York  
New Delhi · Bangkok · Singapore · Tokyo · Sydney

S. Karger AG  
P.O. Box, CH-4009 Basel  
Switzerland

Telephone +41 61 306 11 11  
Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch

www.karger.com

0650\*





## Assignment\* of ppk98 (TRA1) to pig chromosome 5 by fluorescent in situ hybridization and confirmation by somatic cell hybrid analysis.

\*To our knowledge this is the first time this gene has been mapped.

J. H. Calvo,<sup>a</sup> N.L. Lopez-Corrales,<sup>a</sup> S.I. Anderson,<sup>a</sup> A. Robic,<sup>b</sup> P. Zaragoza,<sup>a</sup> A.L. Archibald,<sup>c</sup> and R. Osta,<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, c/Miguel Servet 177, Zaragoza, SPAIN

<sup>b</sup>Laboratoire de Génétique Cellulaire. INRA. Castanet-Tolosan. France.

<sup>c</sup>Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian, Scotland, UK

### Rationale and significance

Porcine protein kinase 98 is a stress-inducible glycoprotein that is known to be constitutively and ubiquitously expressed in the endoplasmic reticulum of mammalian cells (Dechert et al., 1994). The genomic DNA sequence of PPK98 gene has been determined by König et al. (1997). Sequence analyses revealed domains that are highly conserved with the human tumor rejection antigen (TRA1) or glucose-regulated protein (GRP94) genes. These findings suggest that these proteins are either identical or represent a family of closely related proteins (König et al., 1997). The human and mouse TRA1 have been located to human (HSA) chromosome 12 and mouse (MMU) chromosome 10, but, as yet, the porcine ppk98 (TRA1) gene has not been mapped.

We report the localization of the pig ppk98 (TRA1) gene to porcine (SSC) chromosome 5 by fluorescent in situ hybridization and somatic cell hybrid panel. This assignment supports the hypothesis that ppk98 is the porcine homologue of the human TRA1 gene.

### Materials and methods

*Isolation of a large fragment genomic clone for ppk98 (TRA1).* A BAC clone containing the pig ppk98 (TRA1) gene was identified by PCR screening of the PigE BAC library (Anderson et al., in press), using specific primers designed from the described pig ppk98 (TRA1) sequence (König et al., 1997; EMBL accession: X90848):

5'-CTGTCATGGACTCAAGTTC-3'

5'-CTGCTTCACAAAGCTTATAG-3'

PCR amplification was performed using 25 ng of pig DNA. Cycling conditions were 94°C for 30s, 55°C for 30s and 72°C for 30s for 30 cycles.

Partial sequence analysis of the BAC clone (43F15 from the PigEBAC library) confirmed the presence of ppk98 (TRA1) sequences (EMBL accession: X90848)

*Fluorescence in situ hybridization (FISH).* Probe isolation was carried out essentially as described previously by Lichter et al. (1990), using chromosome spreads from 2-3 unrelated adult pigs. FISH experiments were carried out twice, using duplicate slides. A total of 40 R-banded metaphase spreads were scored for FISH signals in each experiment. Pig R-banded

chromosomes were obtained according to the original Lemieux et al. (1992). BAC DNA from the ppk98 (TRA1) clone (43F15) was labeled with biotin by nick-translation using a BioNick kit (GIBCO) and purified on Sephadex columns (5prime-3prime). Hybridization signals were detected with FITC-avidin (Boehringer Mannheim) and chromosomes were counter-stained with propidium iodide (Sigma) and PPD (Sigma) adjusted to pH 11 as antifade solution

Probe name(s): 43F15 from the pPigE BAC library.

Probe type: Genomic DNA

Vector: pBeloBAC11.

Insert size: 150 Kb.

Proof of authenticity: DNA sequencing.

Gene reference: X90848

*Somatic cell hybrid panel.* A porcine rodent somatic cell hybrid panel (Yerle et al., 1996) was screened for the pig ppk98 (TRA1) gene by PCR. The primers and PCR conditions used were as described in above.

### Results

Mapping data: 5

*Most precise location:* SSC5q23

*No. of cells examined:* 80

*Number of cells with specific signal:*

1 ( 0 ), 2 ( 15 ), 3 ( 3 ), 4 ( 52 ) chromatids per cell

Location of background signals: none observed

Mapping by somatic cell hybrid analysis:

*Most precise location:* SSC5(1/2q21)-q24

*Correlation coefficient:* 0.9282

Probability: 0.89

The FISH and somatic cell hybrid analysis confirm the assignment of the porcine ppk98 (TRA1) gene to SSC5q23. The degree of sequence similarity has been reexamined finding a high homology between ppk98 and human and mouse TRA1 gene. The human TRA1 gene maps to HSA12q24.2-qter (GDB: 127926). The mouse TRA1 gene maps to MMU 10. As HSA12 and MMU10 are already known to share some conserved chromosomal segments with SSC5 the hypothesis of identification of ppk98 as the porcine

homologue of the human and mouse TRAI gene is supported by high sequence similarity between ppk98 and TRAI genes (human and mouse TRAI) and comparative map locations.

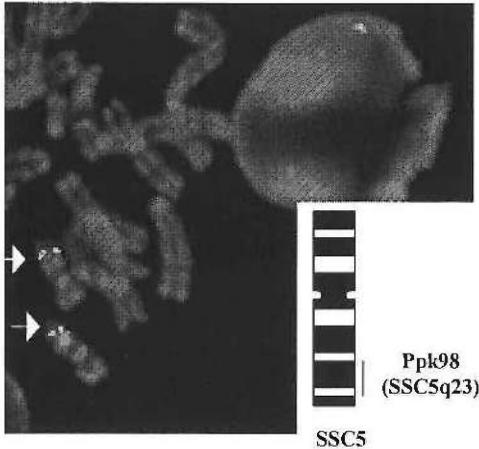


FIGURE 1 Chromosomal mapping of *ppk98* by FISH. The arrows show the positive signal indicates the site of specific hybridization to chromosome 5 (SSC5q23).

Grant support or other acknowledgements: J.H.C. was supported by a doctoral grant from the M.E.C. (AP97). R.O. and P.Z. were supported by project UZ210-47. S.I.A., N.L.L.-C., and A.L.A. were supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (UK).

Received ; manuscript accepted  
(Above dates will be entered by the editors.)

Request reprints from Jorge H. Calvo. Laboratorio de Genética Bioquímica, Facultad de Veterinaria, c/ Miguel Servet, 50013 Zaragoza, Spain. Ph 34976761619. Fax 34976761612. Email [jhcalvo@posta.unizar.es](mailto:jhcalvo@posta.unizar.es).

#### References

- Anderson SI, Lopez-Corrales NL, Gorick B, Archibald AL: A large fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mammal Genome* (in press)
- Dechert U, Weber P, König B, Ortwein C, Nilson I, Linxweiler W, Wolny E, Gassen HG: A protein kinase isolated from porcine brain microvessels is similar to a class of heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.*, 225 (3): 805-809 (1994).
- König B, Seehaus B, Bangsow T, Oberthur A, Henninger J, Weber P, Schepelmann S, Wolny E, Gassen HG: Cloning and characterization of a porcine kinase gene and relationship to a class of heat shock proteins. *DNA Cell Biol.*, 16 (11): 1365-1372 (1997).
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E: A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single copy genes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 59 (4): 311-312 (1992).
- Lichter P, Tang CC, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC: High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247: 64-69 (1990).
- Yerle M, Echard G, Robic A, Mairal A, Dubut-Fontana C, Riquet J, Pinton P, Milan D, Lahbib-Mansais Y, Gellin J. A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet.* 73: 194-202 (1996).

Anexo 9: ppk98

Figura 21. Actual situación del SSC5.

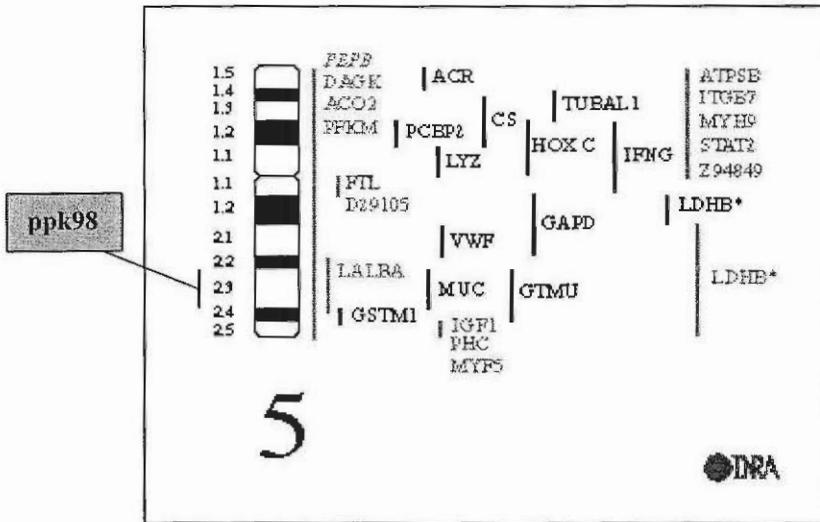
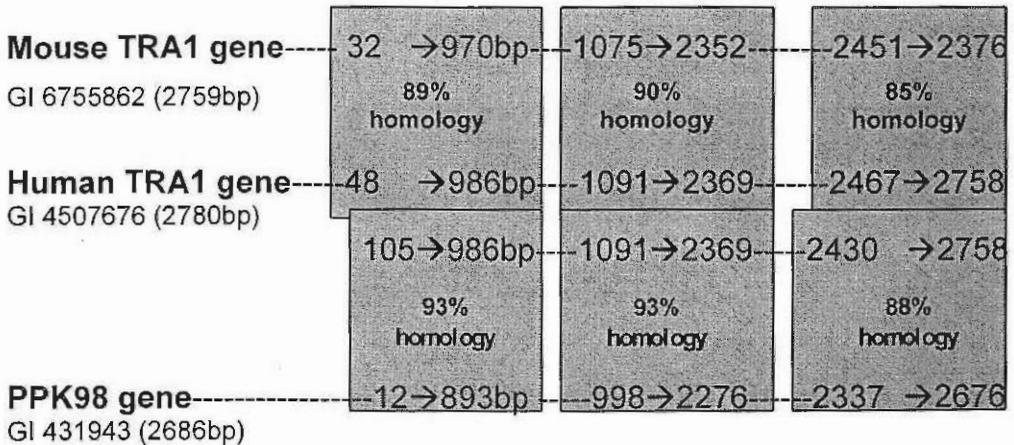


Figura 22. Esquema de las homologías encontradas entre el ppk98 porcino, TRA1 humano y TRA1 en ratón.





## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

En las condiciones de nuestra experiencia, las conclusiones obtenidas a partir de los resultados presentados pueden resumirse:

### SOBRE LA AUTENTICACIÓN DE ESPECIE EN PRODUCTOS ALIMENTÍCEOS

1ª Con el objeto de aislar fragmentos de ADN especie-específicos altamente repetidos en el genoma, se ha desarrollado un procedimiento para detectar, mediante una amplificación con cebadores inespecíficos, secuencias altamente repetidas en el genoma. Mediante esta metodología, denominada I.R.A.R.S, se han aislado secuencias no estudiadas en el genoma porcino, de las cuales un porcentaje superior al 50% presentaron motivos de repetición, y un 6% presentaron microsatélites.

2ª Tres microsatélites aislados mediante I.R.A.R.S. fueron polimórficos, presentando 3 alelos en el caso de s0614 y s0616 y 2 alelos en el caso del s0615. En todos los casos presentaron herencia mendeliana, y fueron localizados físicamente en los cromosomas SSC1 para los microsatélites s0615 y s0616, y en el SSC8 en el caso de s0614. Además mediante mapeo genético se confirmó el mapeo físico de s0614 y s0616. Esta aportación aumenta la resolución del mapa porcino.

3ª A partir de una secuencia de 171 pares de bases aislada mediante I.R.A.R.S., se ha desarrollado un procedimiento para analizar la presencia de distintos componentes porcinos en alimentos. Se utiliza la amplificación de dicho fragmento altamente repetido para detectar la presencia de cerdo en productos procesados y no, detectando hasta un 1.25 pg de ADN que se corresponden con un 0.005% de carne/paté de cerdo en vaca/pato.

4ª El tratamiento térmico de la carne no afecto a la identificación de carne de cerdo, mediante la amplificación del fragmento específico de cerdo, identificando la presencia de cerdo en productos tratados térmicamente a 80 y 120°C durante 30 minutos, así como en patés autoclavados. Asimismo, la técnica se ha aplicado con éxito en productos procesados como salchichas, jamón serrano, mortadela e incluso en grasa de cerdo.

5ª Respecto a la identificación de posibles fraudes con el método descrito, se han detectado en hamburguesas de pollo y vaca, así como en patés de pato en los cuales se detectó la presencia de cerdo. En el caso del paté de pato, supuestamente puro, se encontró más de un 50% de cerdo.

6ª Asimismo, se ha desarrollado un procedimiento para cuantificar el porcentaje de carne porcina en un producto alimenticio, mediante la amplificación del fragmento de ADN específico de cerdo, utilizando la recta de regresión  $y = 0.918x - 2.221$  con una correlación de 0.99 y con un error del 3%.

7ª Se ha desarrollado un procedimiento para detectar la composición de especie en quesos mediante la técnica RAPD-PCR. Mediante esta técnica ha sido posible detectar, mediante un único PCR, mezclas de quesos de bovino, caprino y ovino, hasta 25 pg de ADN en las tres especies.

8ª Se ha desarrollado un procedimiento para detectar la composición de especie en patés mediante la técnica RAPD-PCR. Mediante esta técnica ha sido posible detectar, mediante un único PCR, mezclas de patés de cerdo, pato y pollo, hasta 250 pg de ADN en las tres especies.

9ª Utilizando la técnica RAPD-PCR en patés se han detectado fraudes de introducción de cerdo y pollo en paté de pato.

## CALIDAD INTRÍNSECA DE LOS ALIMENTOS

10<sup>a</sup> Con el objetivo de aislar genes candidatos a QTLs/ETLs se han aislado por primera vez fragmentos de ADN pertenecientes a los genes acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$  (ACACA) y la maltasa-glucoamilasa (MGAM).

11<sup>a</sup> Mediante la utilización de librerías de ADN genómico clonado en BACs, se han localizado físicamente en los cromosomas SSC12 en el caso de la acetil-CoA carboxilasa y SSC2 para la maltasa glucoamilasa.

12<sup>a</sup> A partir de dos microsatélites polimórficos obtenidos a partir de los BACs que contienen los fragmentos de la acetil-CoA carboxilasa y la maltasa glucoamilasa se ha confirmado mediante mapeo genético las localizaciones físicas, colaborando a la unión de los mapas físico y genético.

13<sup>a</sup> La localización de la maltasa-glucoamilasa en el SSC2 ha permitido clarificar un punto de ruptura de la conservación del grupo de sintenia, en el que se localiza la maltasa glucoamilasa, con el cromosoma humano HSA7, contribuyendo de forma importante a la cartografía comparativa entre la especie porcina y humana.

15<sup>a</sup> La variación observada en los microsatélites aislados en la ACACA y MGAM no ha mostrado asociación con los caracteres productivos de familias estudiadas, sin embargo, debido a la importancia fisiológica de estos genes, sería interesante continuar con el estudio de los mismos.

17<sup>a</sup> Por último, se ha realizado la cartografía física del gen ppk98 (TRA1) en el cromosoma porcino SSC5. Este asignamiento ha confirmando la hipótesis de que ppk98 es TRA1, ya que el gen TRA1, tanto en humana como en ratón, mediante cartografía comparativa debería localizarse en el SSC5.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Abe, K., Shinohara, Y. y Terada, H. (1998). Isolation and characterization of cDNA encoding rat heart type acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Biophys Acta*, **1398** (3): 347-352.
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G. y Wakil, S.J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97** (4): 1444-1449.
- Abu-Elheiga, L., Jayakumar, A., Baldini, A., Chirala, S.S. y Wakil, S.J. (1995). Human acetyl-CoA carboxylase: Characterization, molecular cloning and evidence for two isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4011-4015.
- Al-Feel, W., Chirala, S.S. y Wakil, S.J. (1992). Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 4534-4538.
- Amigo, L., Ramos, M., Calhau, L. y Barbosa, M. (1992). Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing, and immunodiffusion in determinations of cows and goats milk in Serra da Estrela cheeses. *Lait*, **72**: 95-101.
- Anderson, S.I., Lopez-Corrales, N.L., Gorick, B. y Archibald A.L. A large fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mammal Genome* (in press)
- Andersson, L., Haley, C.S., Ellegren, H., Knott, S.A., Johanson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund, L., Edfors-lidja, I., Fredholm, M., Hansson, I., Hakansson, J. y Lundström, K.. (1994). Genetic mapping of quantitative trait loci for Growth and fatness in pigs. *Science*, **263**: 1771-1774.

- Andersson.Eklund, L., Marklund, L., Lundstrom, K., Haley, C.S., Andersson, K., Hansson, I., Moller, M. y Andersson, L. (1998). Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar x Large White intercross. *J. Anim. Sci.*, **76 (3)**: 694-700.
- Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A.I., González, I., Sanz, B. y Hernández, P.E. (1997). A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Food Prot.*, **60 (1)**: 64-66.
- Aranda, P., Sanchez, L., Perez, M.D., Ena, J.M., Puyol, P., Oria, R. y Calvo, M. (1993). Rapid immunoenzymatic method for detecting adulteration in ewes milk. *Food Control*, **4 (2)**: 101-104.
- Archibald, A.L., Haley, C.S., Brown, J.F., Couperwhite, S., McQueen, H.A., Nicholson, D., Coppieters, W., Van de Weghe, A., Stratil, A., Winterø, A.K., Fredholm, M., Larsen, N.J., Nielsen, V.H., Milan, D., Woloszyn, N., Robic, A., Dalens, M., Riquet, J., Gellin, J., Caritez, J-C., Burgaud, G., Ollivier, L., Bidanel, J-P., Vaiman, M., Renard, C., Geldermann, H., Davoli, R., Ruyter, D., Verstege, E.J.M., Groenen, M.A.M., Davies, W., Høyheim, B., Keiserud, A., Andersson, L., Ellegren, H., Johansson, M., Marklund, L., Miller, J.R., Anderson, Dear D.V., Signer, E., Jeffreys, A.J., Moran, C., Le Tissier, P., Muladno, M., Rothschild, M.F., Tuggle, C.K., Vaske, D., Helm, J., Liu, H-C., Rahman, A., Yu T-P., Larson. R.G. y Schmitz, C.B. (1995). The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammal Genome*, **6**:157-175.
- Ashoor, S.H., Monte, W.C. y Stiles, P.G. (1990). Liquid chromatographic identification of meats. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71 (2)**: 397-403.

- Ashurst, P.R. y Dennis, M.J. (1996). Authenticity of meat and meat products. En: Food authentication. *Chapman & Hall*.
- Ayob, M.K., Ragab, A.A., Allen, J.C., Rittenberg, J. y Smith, J. (1989). An improved rapid ELISA technique for detection of pork in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **49**: 103-116.
- Barber, M.C. y Travers, M.T. (1995). Cloning and characterization of multiple acetyl-CoA carboxylase transcripts in ovine adipose tissue. *Gene*, **154 (2)**: 271-275.
- Barber, M.C. y Travers, M.T. (1998). Elucidation of a promoter activity that directs the expression of acetyl-CoA carboxylase alpha with an alternative N-terminus in a tissue-restricted fashion. *Biochem. J.*, **333**: 17-25.
- Bauer, C., Teifel-Greding, J. y Liebhardt. (1987). Species identification of heat denaturated meat samples by DNA analysis. *Archv. Für Lebensmittelhygiene*, **38**: 149-176.
- Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B. et al (1988). Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme – linked immunoabsorbent assays. *J. assoc. Off. Anal. Chem.*, **71(2)**: 406-409.
- Borgo, R., Soulie-Crosset, C., Bouchon, D. y Gomot, L. 1996. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *J. Food Sci.* **61**: 1-4.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. y Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American J. Human Genet.*, **32**: 314-331.

- Brostrom, M.A., Cade, C., Prostko, C.R., Gmitter-Yellen, D. y Brostrom, C.O. (1990). Accomodation of protein synthesis to chronic deprivation of intracellular sequestred calcium. A putative role for GRP78 *J. Biol. Chem.*, **265**: 20539-20546.
- Buntjer, J.B., Lenstra, J.A. y Haagsma, N. (1995). Rapid species identification in meat by using satellite DNA probes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **201(6)**: 577-582.
- Buxade, C. (1995). Curso sobre ganado porcino. Noviembre 1995. ETSIA. Pamplona.
- Buxade, C. (1995). La ganaderia en la unión europea. En: Zootecnia bases de la producción animal. Tomo I. Capítulo III. C. Buxade (coordinador). Ed. Mundi-prensa.
- Cala, S.E. y Jones, L.R. (1994). GRP94 resides within cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles and its phosphorylated by casein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **269 (8)**: 5926-5931.
- Cardello, A.V. (1995). Food quality: relativity, contex and consumer expectations. *Food quality pref.*, **6**: 163.
- Carnegie, P.R. (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas Biotechnol.*, **4 (3)**: 146-149.
- Casas-Carrillo, E., Prill-Adams, A., Price, S.G., Clutter, A.C. y Kirkpatrick, B.W. (1997). Relationship of groth hormone and insulin.like growth factor-1 genotypes with growth and carcass traits in swine. *Anim. Genet.*, **28 (2)**: 88-93.
- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernández, A., Hernández, P.E. y Martín, R. (1999). Identification of Sole (*Solea solea*) and Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 1046-1050.

- Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa y Kato, S. (1990). Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Sci.*, **27**: 119-128.
- Chinuki, K., Tabata, T. Y Kosugiyama, M. (1994). Polymerasa chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Sci.*, **37**: 337-345.
- Chretien, S., Dubart, A., Beaupain, D., Raich, N., Grandchan, B., Rosa, J., Goossens, M. y Romeo, P.H. (1988). Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue specific or in housekeeping expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85 (1)**: 6-10.
- Clamp, P.A., Beever, J.E., Fernando, R.L., McLaren, D.G. y Schook, L.B. (1992). Detection of linkage between genetic markers and genes that affect growth and carcass traits in pigs. *J. Anim. Sci.*, **70 (9)**: 2695-2706.
- Cota-Rivas, M. y Vallejo-Córdoba, B.V. (1997). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *J. Capillary Electrophor.*, **4(4)**: 195-199.
- Crimes, A.A., Hichcock, C.H.S. y Wood, R. (1984). Determination of soya protein in meat products by an enzyme-linked immunosorbent assay procedure: Collaborative study. *J. Assoc. Public Analysts*, **22**: 59-78.
- Crosland, A.R., Patterson, R.L.S., Higman, R.C., Stewart, C.A. y Hargin, K.D. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: I: Chemical Composition. *Meat Sci.*, **40**: 289-302.

- Cutrufelli, M.E., Mageau, R.P., Schwab, B. y Johnston, R.W. (1986). Development of poultry rapid overnight field identification test (PROFIT). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69** (3): 483-487.
- Cutrufelli, M.E., Mageau, R.P., Schwab, B. y Johnston, R.W. (1987). Detection of beef and poultry by serologic field screening test (ORBIT and PROFIT): Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70** (2): 230-233.
- Cutrufelli, M.E., Mageau, R.P., Schwab, B. y Johnston, R.W. (1988). Development of porcine rapid identification method (PRIME). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**(2): 444-445.
- Cutrufelli, M.E., Mageau, R.P., Schwab, B. y Johnston, R.W. (1989). Development of serological ovine field test (SOFT) by modified agar gel immunodiffusion. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**(1): 60-61.
- Cutrufelli, M.E., Mageau, R.P., Schwab, B. y Johnston, R.W. (1993). Development of a multispecies identification field test by modified agar-gel immunodiffusion. *J. AOAC*, **76**(5): 1022-1026.
- Dahlqvist, A. (1962). Specificity of the human intestinal disaccharidases and implications for hereditary disaccharide intolerance. *J. Clin. Invest.*, **41**: 463.
- Danielsen, E.M., Sjöström, H. y Norén, O. (1983). Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Pulse-chase labelling studies on maltase-glucoamylase, aminopeptidase A and dipeptidyl-peptidase IV. *Biochem. J.*, **210**: 389-393.
- Dechert, U., Weber, P., König, B., Ortwein, C., Nilson, I., Linxweiler, W., Wollny, E. y Gassen, H.G. (1994). A protein kinase isolated from porcine brain microvessels is similar to a class of heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.*, **225** (3): 805-809.

- Dincer, B., Spearow, J.L., Cassens, R.G. y Greaser, M.L. (1987). The effect of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques. *Meat Sci.*, **20** (4): 253-265.
- Dunnington, E.A., Stallard, L.C., Siegel, P.B. y Hillel, J. (1993). Evaluating linkage between DNA fingerprint bands and quantitative traits in chickens: interactions. *Poult. Sci.*, **72** (6): 1000-1004.
- Dysseler, P., Jacquain, D. y Karydas, J. (1986). Elestrophoretic determination of gliadinsin cooked food. *Belgian J. Food Chem. Biotechnol.*, **41**(6): 143-149.
- Ebbehøj, K.F. y Thomsen, P.D. (1991a). Species differentiation of heated mear products byDNA hybridization. *Meat Sci.*, **30**: 221-234.
- Ebbehøj, K.F. y Thomsen, P.D. (1991b). Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridation. *Meat Sci.*, **30**: 359-366.
- Economou, E.P., Bergen, A.W., Warren, A.C. y Antonarkis, S.E. (1990). The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**: 2951-2954.
- Ellegren (1993). Abundant (T)<sub>n</sub> (A)<sub>n</sub> mononucleotide repeats in the pig genome: linkage mapping of the porcine APOB, FSA, ALOX12, PEPN and RNL loci. *Anim. Genet.*, **24**: 367-372.
- Eriksson, A. Y Yman, I.M. (1992). Food safety and quality assurance: Applications of immunoassay systems. (EDS., M.R.A. Morgan, C.J., Smith, P.A., Williams). *Elvesier Applied Science*, Amsterdam, 65-68.

- Fergusson, C.S., Racicot, P.A. y Rane, L. (1942). Study of use of presipitin test for determination of soy four sausages. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **25**: 533.
- Flint, F.O. y Firth, B.M. (1982). A toluidine blue stainmountant for the microscopy of comminuted meat product. *Analyst*, **106**: 1242-1243.
- Flint, F.O. y Meech, M.V. (1978). Quantitative determination of texturised soya proteins by a stereological technique. *Analyst*, **103**: 252-258.
- Forcada, F. (1997). Alojamientos para ganado porcino. MIRA Editores.
- Fox, J.R., Duthie, H. Y Wulff, S. (1988). Precision and sensitivity of a test for vegetable fat adulteration of milk fat. *J. Dairy Sci.*, **71**: 574-581.
- Freire, J.P., Mourot, J., Cunha, L.F., Almeida, J.A. y Aumaitre, A. (1998). Effect of the source of dietary fat on postweaning lipogenesis in lean and fat pigs. *Ann. Nutr. Metab.*, **42 (2)**: 90-95.
- Frengen, E., Thomsen, P., Kristensen, T., Krans, S., Miller, R. y Davies, W. (1991). Porcine SINEs: Characterization and use in species-specific amplification. *Genomics*, **10**: 949-956.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khana, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J. y MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with Malignant Hyperthermia. *Science*, **253**: 448-453.
- Gallagher, P.C., Lear, T.L., Coogle, L.D. y Bailey, E. (1999). Two SINEs families associated with equine microsatellite loci. *Mamm. Genome*, **10**: 140-144.

- Galluser, M., Belkhou, R., Freund, J-N, Duluc, I., Torp, N., Danielses, M.y Raul, F. (1991). *J. Comp. Physiol., B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, **161**: 357-361.
- García, T., Martín, R., Morales, P., Gonzalez, I., Sanz, B. y Hernandez, P. (1993). Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk. *Milchwissenschaft*, **48**:10.
- Gellin, J., Benne, F., Hors-Cayla, M.C. y Gillois, M. (1980). Gene mapping in the pig (*Sus scrofa* 1). Study of two syntenic groups G6PD, PGK, HPRT and PKM2, MPI. *Ann. Genet.*, **23 (1)**: 15-21.
- Gething, M.J. y Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, **355**: 33-45.
- Gilbert, N y Labuda, D. (1999). CORE-SINEs: eukaryotic short interspersed retroposing elements with common sequence motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96 (6)**: 2869-2874.
- Gillespie, B.E., Owens, W.E., Nickerson, S.C. y Oliver, S.P. (1999). Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from Heifer mammary secretions and from Horn flies. *J. Dairy Sci.*, **82**: 1581-1585.
- Glynn, J.H. (1939). Quantitative determination of soya bean protein in sausage and other protein mixtures. *Science*, **89**: 444.
- Green, P., Falls, K. y Crooks, S. (1990). Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- Griffiths, N.M. y Billington M.J. (1984). Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for beef blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures. *J. Sci. Food Agric.*, **35**: 909-914.

- Griffiths, N.M., Billington, M.J. y Crimes, A.A. (1984). An assesment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunoabsorbent assay of soya protein in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **35**: 1255-1260.
- Grobet, L., Hanset, R. y Dasnois, C. (1992). Repónse au test l'halothane et génotype au locus RYR-1 du récepteur á la ryanodine chezdes porcs croisés. *Ann. Med. Vet.*, **136**: 249-257.
- Gwakisa P.S., Kemp S. J. y Teale A.J. (1994). Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim. Genet.*, **25 (2)**:89-94.
- Ha, J., Daniel, S., Kong, IS., Park, CK., Tae, HJ. y Kim, KH. (1994). Cloning of human acetyl- CoA carboxylase cDNA. *Eur. J. Biochem.*, **219**: 297-306.
- Ha, J., Lee, JK., Kim, KS., Witters, LA. y Kim , KH. (1996). Cloning of human acetyl.CoA carboxylase- $\beta$  and its unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**: 11466-11470.
- Hablacher, M., Ivessa, A.S., Paltauf, F. y Kohlwein, S.D. (1993). Acetyl-CoA carboxylase from Yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **268 (15)**: 10946-10952.
- Hall, C.C., Hitchcock, C.H.S. y Wood, R. (1987). Determination of soya protein in meat products by a commercial enzyme immunoassay procedure: collaborative trial. *J. Assoc. Public Analysts*, **25**: 1-27.
- Hanotte, O., Bruford, M.W. y Burke, T. (1992). Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. *Heredity*, **68**: 481-494.

- Hayden, A.R. (1978). Determination of residual species serum albumin in adulterated ground beef. *J. Food. Sci.*, **43**: 476-478.
- Hayden, A.R. (1979). Immunological detection of ovine, porcine and equine flesh in beef products with antisera to species myoglobin. *J. Food. Sci.*, **44**(2): 494-500.
- Hayden, A.R. (1981). Use of antisera to heat-stable antigens of adrenal for species identification in thoroughly cooked beef sausages. *J. Food. Sci.*, **46**: 1810-1813.
- Hayward, B.E., Zavanelli, M. y Furano, A.V. (1997). Recombination creates novel L1 (LINE1) elements in *Rattus norvegicus*. *Genetics*, **146**: 641-654.
- Hewedey, M.M. y Smitch, C.J. (1989). Detection of soy milk in pasteurised bovine milk. *Food Hydrocolloids*, **3** (5): 399-405.
- Hitchcock, C.H.S. y Crimes, A.A. (1985). Methodology for meat species identification: A review. *Meat Sci.*, **15**: 215.
- Hitchcock, C.H.S., Bailey, F.J. y Crimes, A.A. (1981). Determination of soya proteins in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *J. Sci. Food Agric.*, **32**: 157-165.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. y Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 7276-7280.
- Hsieh, Y.H., Sheu, S.C. y Bridgman, R.C. (1998). Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *J. Food Prot.*, **61** (4): 476-481.
- Hu, Z., Rohrer, G.A., Stone, R.T., Murtaugh, M.P. y Beattie, C.W. (1997). Genomic mapping of chemokine and transforming growth factor genes in swine. *Mamm. Genome*, **8**: 246-249.

- Hunt, D.J., Parkes, H.C., y Lumley, I.D. (1998). Identification of the species of raw and cooked meat products using oligonucleotides probes of origin. *Food Chem.*, 60 (3): 437-442.
- Hwu, H.R., Roberts, J.W., Davidson, E.H. y Britten, R.J. (1986). Insertion and or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 3875-3879.
- Iantsen, E.I., Ptitsyn, A.A., Filipenko, M.L., Batyrina, O.A., Muravlev, A.I. y Mertvetsov, N.P. (1997). A new-PCR primer for specific amplification of human DNA fragments selected on the basis of computer analysis of the nucleotide sequences of MER1 dispersed repeats in man. *Genetika*, 33 (2): 243-248.
- Iverson, J.L. y Sheppard, A.J. (1989). Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilising gas-liquid chromatographic fatty acid data. *J. Dairy Sci.*, 72: 1707-1712.
- Janssen, F.W., Hogele, G.H., Voorspoppel y Baaij, J.A. (1990). Myoglobin analysis for determination of beef, pork, horse, sheep, and kangaroo meat in blended cooked products. *J. Food Sci.*, 55 (6): 1528-1530.
- Janssen, F.W., Voortman, G. y Baaij, J.A. (1986). Detection of soya proteins in heated meat products by blotting and dot-blot. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 182, 479-483.
- Janssen, F.W., Voortman, G. y Baaij, J.A. (1987). Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovoalbumin and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting and immunoperoxidase staining. *J. Agricol. Food Chem.*, 35: 563-567.

- Jones, S.L. y Patterson, R.L.S. (1985). Double antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures. *Meat Sci.*, **15**: 1-13.
- Jones, S.L. y Patterson, R.L.S. (1986). A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilised immunoreagents. *J. Sci. Food Agric.*, **37**: 767-775.
- Jung, Y.C., Rothschild, M.F., Flanagan, M.P., Christian, L.L. y Warner, C.M. (1989). Association of restriction fragment length polymorphism of swine leucocyte antigen class I genes with production traits of Duroc and Hampshire boars. *Anim. Genet.*, **20** (1): 79-91.
- Kaiser, K.P., Matheis, G. y Knita-Durrmann, C. (1980). Qualitative and quantitative analysis of raw binary meat mixtures by means of isoelectric focussing. *Z. Letensm. Unters. Forch.*, **171**: 415-419.
- Kang'ethe, E.K., Jones, S.J. y Patterson, R.L.S. (1982). Identification of the species of origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Sci.*, **7**: 229-240.
- Kauffer, K., Beneke, B. y Bentler, W. (1990). Detection of comminuted chicken meat in native and heated meat mixtures by means of isoelectris focussing in polyamide gels. *Fleischwirtsch* **70**(10): 1188-1194.
- Kawashima, I., Mita-Honjo, K. y Takiguchi, Y. (1992). Charaxterization of the primate-specific repetitive DNA element MER1. *DNA Seq.*, **2** (5): 313-318.
- Kelly, J.J. y Alpers, D.H. (1981). Properties of human intestinal glucoamylase. *Biochem. Biophys. Acta*, **315**: 113.

- Kennedy, B.W., Verrinder, A.M., Gipson, J.P. y Smith, C. (1990). Coalescence of molecular and quantitative genetics for livestock improvement. *Journal of Dairy Science*, **73**: 2619-2627.
- Kim, H. Y Shelef, L.A. (1986). Characterization and identification of raw beef, pork, chicken and turkey meats by electrophoretic patterns of their sarcoplasmis proteins. *J. Food Sci.*, **51**:731-741.
- Kim, J.M., Yoon, M., Kang, I., Kim, S.S. y Ha, J. (1998). Evidence that Acetyl-CoA carboxylase isoforms play different biological roles in H9C2 cardiomyocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248** (3): 490-496.
- Kim, KH. y Tae, HJ. (1994). Pattern and regulation of Acetyl-CoA carboxylase gene expression. *Symposium: Dietary fat and gene expression*. Experimental Biology '93 meeting: 1273-1284.
- Kim, U.J., Birrei, B.W., Slepak, T., Mancino, U., Boysen, C., Kang, H.L., Simon, M.I. y Shizuya, H. (1996). Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, **34** (2): 213-218).
- Kim, Y.H., Park, G.B., Lee, M.H. y Jin, S.K. (1987). Studies on the determination of non-meat proteins in chicken products. *Korean J. Animal Sci.*, **29**(9): 416-419.
- Kim, Y.K., Kim, K.S. y Lee, A.S. (1987). Regulation of the glucose-regulated protein genes by beta-mercaptoethanol requires de novo protein synthesis and correlates with inhibition of protein glycosylation. *J. Cell Physiol.*, **133**: 553-559.
- King, N.L. (1984). Species identification of cooked meats by enzyme staining of isoelectric focussing gels. *Meat Sci.*, **11**: 59-72.

- King, N.L. y Kurth, L. (1982). Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme-staining of isoelectric-focussing gels. *J. Food Sci.*, **47**:1608-1612.
- Klijn, N., Bovie, C., Dommès, J., Hoolwerf, J.D., van der Waals, C.B., Weerkamp, A.H. y Nieuwenhof, F.F.J. (1994). Identification of *Clostridium Tyrobutyricum* and related species using sugar fermentation, organic acid formation and DNA probes based on specific 16S rRNA sequences. *Syst. Appl. Microbiol.*, **17**: 249-256.
- Knorr, C., Moser, G., Müller, E. y Geldermann, H. (1997). Associations of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Piétrain and Meishan pigs. *Anim. Genet.*, **28**: 124-128.
- Knott, S.A., Marklund, L., Haley, C.S., Andersson, K., Davies, W., Ellegren, H., Fredholm, M., Hansson, I., Hoyheim, B., Lundstrom, K., Moller, M. y Andersson, L. (1998). Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics*, **149** (2): 1069-1080.
- Koch, G., Smith, M., Macer, D., Webster, P. y Morata, R. (1986). Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. *J. Cell Sci.*, **86**: 217-232.
- Koh, M.C., Lim, C.H., Chua, S.T., Chew, S.T. y Phang, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Sci.*, **48**: 275-285.
- Koning, B., Seehaus, B., Bangsow, T., Oberthur, A., Henninger, J., Weber, P., Schepelmann, S., Wollny, E. y Gassen, H.G. (1997). Cloning and characterization of a porcine kinase gene and relationship to a class of heat shock proteins. *DNA Cell Biol.*, **16** (11): 1365-1372.

- Koning, D.J., Janss, L.L., Rattink, A.P., van Oers, P.A., de Vries, B.J., Groenen, M.A., van der Poel, J.J., de Groot, P.N., Brascamp, E.W. y van Arendonk, J.A. (1999). Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, **152** (4): 1679-1690.
- Kouba, M y Mouroto, J. (1998). Effect of high linoleic acid diet on delta 9-desaturase activity, lipogenesis and lipid composition of pig subcutaneous adipose tissue. *Reprod. Nutr. Dev.*, **38** (1): 31-37.
- Kuryl, J. (1998). Polish project on QTLs mapping in pigs. *Proc. II Pig Workshop of International Society of Animal Genetics*, Breukelen, 17.
- Lahiri, D.K., Bye, S., Nurnberger, J.I. Jr, Hodes, M.E. y Crisp, M. (1992). A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic ADN from whole blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Methods*, **25** (4): 193-202.
- Lanz, P., Tjerneld, F., Borch, E., Hahn-Hägerdal, B. y Radström, P. (1994). Enhanced sensitivity in PCR detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through the use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3416-3418.
- Lebenthal, E., Khin-Maung-U, M.D., Zheng, B-Y, Lu, R-B y Lener, A. (1994). Small intestinal glucoamylase deficiency and starch malaabsorption: A newly recognized alpha-glucosidase deficiency in children. *J. Pidiatr.*, **124**: 541-546.
- Ledbetter, S.A., Nelson, D.L., Warren, S.T. y Ledbetter, D.H. (1990). Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics*, **6** (3): 475-481.

- Lee, J.C. y Chang, J.G. (1994). Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.*, **67** (2): 103-107.
- Lemiux, N., Dutrillaux, B. y Viegas-Pequignot, E. (1992). A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization in small single copy genes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **59** (4): 311-312.
- Levieux, D. y Venien, A. (1994). Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows milk in goats or ewes milk using monoclonal antibodies. *J. Dairy Res.*, **61**:91-99.
- Li, Z. Y Srivastava, K.P. (1993). Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J.*, **12**: 3143-3151.
- Lipman, L.J.A., De-Nijis, A., Lam, T.J.G.M., Rost, J.A., Van-Dick, L., Schukken, Y.H. y Gaastra, W. (1996). Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. *Vet. Microbiol.*, **48**: 51-55.
- Litcher P, Tang CC, Call K, Hermansoh G, Evans GA, Housman D, Ward DC: High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 237: 64-69 (1990).
- Litcher, P., Tang, C.C., Call, K., Hermansoh, G., Evans, G.A., Housman, D. y Ward, D.C. (1990). High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*, **237**: 64-69.
- López-Casillas, F. y Kim, KH. (1989). Heterogeneity at the 5' end of rat Acetyl-CoA carboxylase mRNA. *J. Biol. Chem.*, **264** (13): 7176-7184.

- López-Casillas, F., Bai, D.H., Luo, X., Kong, I.S., Hermodson, M.A. y Kim, K.H. (1988). Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-Coenzyme A carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 5784-5788.
- López-Casillas, F., Luo, X., Kong, I.S. y Kim, K.H. (1989). Characterization of different forms of rat mammary gland acetyl-coenzyme A carboxylase mRNA: analysis of heterogeneity in 5' end. *Gene*, **83**: 311-319.
- López-Fandino, R., Acedo, M.I. y Ramos, M. (1993). Comparative study of HPLC of caseinomacropetides from cows, ewes and goats milk. *J. Inst. Dairy Res.*, **60**: 117-121.
- Luo, X.C. y Kim, K.H. (1990). An enhancer element in the house-keeping promoter for acetyl-CoA carboxylase gene. *Nucleic Acids Res.*, **18 (11)**: 3249-3254.
- Luo, X.C., Park, K., López-Casillas, F. y Kim, K.H. (1989). Structural features of the Acetyl-CoA carboxylase gene: Mechanisms for the generation of mRNAs with 5' end heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**: 4042-4046.
- Mabrouk, G.M., Helmy, I.M., Thampy, K.G. y Wakil, S.J. (1990). Acute hormonal control of acetyl-CoA carboxylase. The roles of insulin, glucagon and epinephrine. *J. Biol. Chem.*, **265 (11)**: 6330-6338.
- Mageau, R.P., Cutrufelli, M.E., Schwab, B. y Johnston, R.W. (1984). Development of an overnight rapid bovine identification test (ORBIT) for field use. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67(5)**: 449-454.
- Malmheden-Yman, I.M. y Sandberg, K. (1987). Differentiation of meat from horse, donkey and their hybrids (mule/hinny) by electrophoretic separation of albumin. *Meat Sci.*, **21 (1)**: 15.

- Marcos, S., Zaragoza, P y Seyfert, H.M. (1999). Estudios preliminares sobre el gen bovino acetil-CoA carboxilasa, gen candidato para la síntesis de grasa. *II Congreso de la Sociedad Española de Genética*.
- Marklund, L., Nystrom, P.E., Stern, S., Andersson-Eklund, L. y Andersson, L. (1999). Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity*, **82**: 134-141.
- Martin, R., Azcona, J.I., Casas, L., Hernández, P.E. y Sanz, B. (1988a). Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *J. Food Protection*, **51 (10)**: 790-794.
- Martin, R., Azcona, J.I., Hernandez, P.E. y Sanz, B. (1992). Partial purification of pig specific soluble muscle proteins. *Fleischwirtschaft*, **72 (6)**: 899-900.
- Martin, R., Azcona, J.I., Tormo, J., Hernández, P.E. y Sanz, B. (1988b). Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme immunoassay. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **23**: 303-310.
- Martin, R., Wardale, R.J., Jones, S.L., Hernandez, P.E. y Pattersson, R.L.S. (1991). Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Sci.*, **30**:23-31.
- Matassi, G., Labuda, D. y Bernardi, G. (1998). Distribution of the mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) in the isochores of the human genome. *FEBS Lett.*, **439 (1-2)**: 63-65.

- Matssunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shitaba, K., Yamada, J. y Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* **51**: 143-148.
- Mazzearella, R.A. y Green, M. (1987). Erp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90 Kda heat shock protein hsp 90 and the 94 Kda glucose regulated protein GRP94. *J. Biol. Chem.*, **262**: 8875-8883.
- McCormick, R.J., Collins, D.A., Field, R.A. y Moore, T.D. (1992). Identification of meat from Game and Domestic Species. *J. Food Sci.*, **57 (2)**: 516-520.
- Meech, M.V. y Kirk, R.S. (1986). Chemical characterization of mechanically recovered meats. *J. Assoc. Public Analysts*, **24**: 13-26.
- Meer, D.P. y Eddinger, T.J. (1996). Polymerase chain reaction for detection of male tissue in pork products. *Meat Sci.*, **44(4)**: 285-291.
- Melnick, J., Aurel, S. y Argon, Y. (1992). The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoblobin chains. *J. Biol. Chem.*, **267 (30)**: 21303-21306.
- Melnick, J., Dull, J.L. y Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, **370**: 373-375.
- Meyer, R., Candrian, U. y Lüthy, J. (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *J. AOAC Int.*, **77 (3)**: 617-622.

- Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J. y Candrian, U. (1995). Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple method for Species Identification in Food. *J. AOAC International*, **78**(6): 1542-1551.
- Meyer, R., Chardonnens, F., Hubner, P. y Luthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **203** (4): 339-344.
- Milan, D., Vignal, A., Canthelou, F., Galman, O., Robic, A., Riquet, J. y Gellin, J. (1994). Heterologous amplification obtained on porcine DNA with 657 pairs of primers from Genethon's Human microsatellites. *Proceedings of the XXIV International conference of Animal Genetics. Anim. Genet.*, **25** (suppl.2): 42.
- Milan, D., Woloszzyn, N., Yerle, M., Le Roy, P., Bonnet, M., Riquet, J., Lahbib-Mansais, Y., Caritez, J.C., Robic, A., Sellier, P., Elsen, J.M. y Gellin, J. (1996). Accurate mapping of the acid meat RN gene on genetic and physical maps of pig Chromosome 15. *Mamm. Genome*, **7**: 47-51.
- Milatovich, A., Plattner, R., Heerema, N.A., Palmer, C.G., Lopez-Casillas, F. y Kim, K.H. (1988). Localization of the gene for acetyl-CoA carboxylase to human chromosome 17. *Cytogenet. Cell Genet.*, **48** (3): 190-192.
- Miller, J.R. (1994). Use of porcine interspersed repeat sequences in PCR-mediated genotyping. *Mamm. Genome*, **5**: 629-632.
- Moio, L., Sasso, M.L. y Chianese, L. (1990). Rapid detection of bovine milk in ovine, caprine and water buffalo milk or cheese by gel isoelectric focusing on Phastsystem<sup>tm</sup>. *Ital. J. Food Sci.*, **3**: 185-190.

- Molina, E., Ramos, M. y Martín-Alvarez, P.J. (1995). Prediction of the percentages of cows', goats' and ewes milk in "Iberico" cheese by electrophoretic analysis in whey proteins. *Z. Lebensm. Forsch.*, **201 (4)**: 331-335.
- Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez, M.J. y Pérez-Martos, A. (en prensa). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of Mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.*
- Morales, P., Garcia, T., Gonzalez, I., Martin, R., Sanz, B. y Hernandez, P.E. (1994). Monoclonal antibody detection of porcine meat. *J. Food Protection*, **52 (2)**: 146-149.
- Moran, C. (1993). Microsatellite repeats in pigs (*Sus Scofra*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Hered.*, **84**: 274-289.
- Mouro, J. y Kouba, M. (1999). Development of intra and intermuscular adipose tissue in growing large white and Meishan pigs. *Reprod. Nutr. Dev.*, **39 (1)**: 125-132.
- Murray, B.W., McClymont, R.A. y Strobeck, C. (1995). Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J. Forensic Sci.*, **40(6)**: 943-951.
- Naim, H.Y., Sterchi, E.E. y Lentze, M.J. (1988). Structure biosynthesis, and glycosilation of human small intestinal maltase-glucoamylase. *J. Biol. Chem.*, **263**: 19709-19717.
- Nelson, D.L., Ledbetter, S.A., Corbo, L., Victoria, R.F., Ramirez-Solis, R., Webster, T.D., Ledbetter, D.H. y Caskey, T. (1989). Alu Polymerase Chain Reaction: A method for rapid isolation of human specific sequences from complex DNA sources. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 1821-1825.

- Neuenschwander, S., Rettenberger, G., Meijerink, E., Jörg, H. y Stranzinger, G. (1996). Partial characterization of porcine obesity gene (OBS) and its localization to chromosome 18 by somatic cell hybrids. *Anim. Genet.*, **27**: 275-278.
- Nichols B L, Eldering J, Hahn D, Quaroni A, Sterchi E: Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. Homology to sucrase-isomaltase. *J Biol Chem* 273(5): 3076-3081 (1998).
- Norén O, Sjöström H, Cowell G M, Tranum-Jensen J, Hansen O C, Welinder K G: Pig intestinal microvillar Maltase-glucoamylase. *J Biol Chem* 261(26): 12306-12309 (1986).
- Nunes, M., Lahbib-Mansais, Y., Geffroin, C., Yerle, M., Vaiman, M. y Renard, C. (1996). Swine cytosolic malic enzyme:cDNA cloning, sequencing, and localization. *Mamm. Genome*, **7**: 815-821.
- Oliver, M.A. (1997). Últimas tendencias conceptuales sobre la calidad de la carne de porcino. En Producción porcina: Aspectos claves. C. Buxade (coordinador). Ed. Mundi-prensa.
- Pas, M.F.W. y Gerbens, F. (1998). Myogenic regulatory genes and fatty acid binding protein genes as genetic markers for livestock production. *Proc. II Pig Workshop of International Society of Animal Genetics*, Breukelen, 10.
- Paszek, A.A., Wilkie, P.J., Flickinger, G.H., Rohrer, G.A., Alexander, L.J., Beattie y Schook, L.B. (1999). Internal mapping of growth in divergent swine cross. *Mamm. Genome*, **10 (2)**: 117-122.
- Patterson, R.L.S. y Jones, S.L. (1989). Species identification in heat processed meat products. *Proceeding of 35<sup>th</sup> International (Copenhagen) Congress on Meat Sci. Technol.*, **2**: 229-236.



- Patterson, R.M. y Spencer, T.L. (1985). Differentiation of raw meat from phylogenically related species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Meat sci.*, **15**: 119-123.
- Patterson, R.M., Whittaker, R.G. y Spencer, T.L. (1984). Improved species identification of raw meat by double sandwich ELISA . *J. Sci. Food Agric.*, **35**: 1018-1023.
- Payne, E. (1971). The use of the fatty acid composition of lipids in the identification of horse and kangaroo meat. *J. Sci. Food Agric.*, **22**: 520-522.
- Pickering, K., Evans, C.L., Hargin, K.D y Stewart, C.A. (1995a). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: III: Microscopy. *Meat Sci.*, **40**: 319-326.
- Pickering, K., Griffin, M, Smethurst, P., Hargin, K.D y Stewart, C.A. (1995b). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: IV: Immunology. *Meat Sci.*, **40**: 327-336.
- Pineiro, C., Barros-Velazquez, J., Perez-Martin, R.I., Martinez, I., Jacobsen, T., Rehbein, H., Kundiger, R., Mendes, R., Etienne, M., Jerome, M., Craig, A., Mackie, I.M. y Jessen, F. (1999). Development of a sodium dodecyl sulfate-polyacrilamye gel electrophoresis reference method for the analysis and identification of fish species in raw and heat-processed samples: a collaborative study. *Electrophoresis*, **20 (7)**: 1425-1432.
- Pitel, F., Fillon, V., Heimel, C., Le Fur, N., el Khadir-Mounier, C., Douaire, M., Gellin, J. y Vignal, A. (1998). Mapping of FASN and ACACA on two chicken microchromosomes disrupts the human 17q syntenic group well conserved in mammals. *Mamm. Genome*, **9 (4)**: 297-300.

- Prager, M.J. (1989). Differential characteristics of fatty acids in cheese from milk of various animal species by capillary gas chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72(3)**: 418-421.
- Ram, J.L., Ram, M.L. y Baidoun, F. (1996). Authentication of tuna and bonito by sequence restriction site of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* , **44**: 2460-2467.
- Rathje, T.A., Rohrer, G.A. y Johnson, R.K. (1997). Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *J. Anim. Sci.*, **75 (3)**: 1486-1494.
- Ravestein, P. y Driedonks, R.A. (1986). Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilised meat products. *J. Food Technol.*, **21**:19-32.
- Refseth, U.H., Fangan, B.M. y Jakobsen, K.S. (1997). Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis*, **18 (9)**: 1519-1523.
- Rittenburg, J.H., Adams, A., Palmer, J. and Allen, J.C. (1987). Improve enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70(3)**: 582-587.
- Rodriguez, E., Martín, R., García, T., Hernández, P.E. y Sanz, B. (1990). Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Dairy Res.*, **57 (2)**: 197-205.
- Rohrer, G.A. y Keele, J.W. (1998a). Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *J. Anim. Sci.*, **76 (9)**: 2247-2254.

- Rohrer, G.A. y Keele, J.W. (1998b). Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *J. Anim. Sci.*, **76** (9): 2255-2262.
- Rohrer, G.A., Ford, J.J., Wise, T.H., Vallet, J.L. y Christenson, R.K. (1999). Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White composite swine population. *J. Anim. Sci.*, **77** (6): 1385-1391.
- Rolland, M.P., Bitri, L. y Besacon, P. (1993). Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine  $\alpha_{s1}$ -casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese. *J. Dairy Res.*, **60**: 413-420.
- Rolland, M.P., Bitri, L. y Besancon, P. (1995). Monospecificity of the antibodies to bovine s1-casein fragment 140-149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *J. Dairy Res.*, **62** (1): 83-88.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. y Rasmussen, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extractions solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**: 37-45.
- Rothschild, M.F. (1994). A major gene for litter size in pigs. *Proc. 5th World Congress Genet. Appl. Livestock Prod.*, Guelph, **18**: 361-364.
- Saed, T., Abu-Dagga, F. y Rahman, H.A. (1986). Detection of pork and lard as adulterants in beef and mutton mixtures. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**(b): 999-1002.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). *Science*, **239**: 487-491.

- Sambrook, J, Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., Nicklen, D. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 5463-5467.
- Savage, A.W.J., Richardson, R.I., Jolley, P.D., Hargin, K.D y Stewart, C.A. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products: II: Gel Electrophoresis. *Meat Sci.*, **40**: 303-318.
- Sawaya, W.N., Mameesh, M.S., El-Rayes, E., et al. (1990). Detection of pork in processed meat by an enzyme-linked immunosorbent assay using antiswine antisera. *J. Food Sci.* **55(2)**: 293-297.
- Schuler, G.D., Boguski, M.S., Stewar, E.A., Stein, L.D., Gyapay, G., Rice, K., White, R.E., Rodriguez-Tomé, P. et al. (1996). *Science*, **274**: 540-546.
- Schweigwer, A., Baudner, S. y Gunther, H.O. (1983). Isolation by free-flow electrophoresis and immunological detection of troponin T from turkey muscle: an application in food chemistry. *Electrophoresis*, **4**:158-163.
- Sellwood, R. (1979). Escherichia coli diarrhoea in pigs with or without the K88 receptor. *Vet. Rec.*, **105 (10)**: 228-230.
- Semenza, G. y Auricchio, S. (1989). Small intestinal disaccharidases. En The metabolic basis of inherited disease II.
- Sherikar, A.T., Karkare, U.D., Knot, J.B. et al (1993). Studies on thermostable antigens, production of species-specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. *Meat Sci.*, **33**: 121-136.

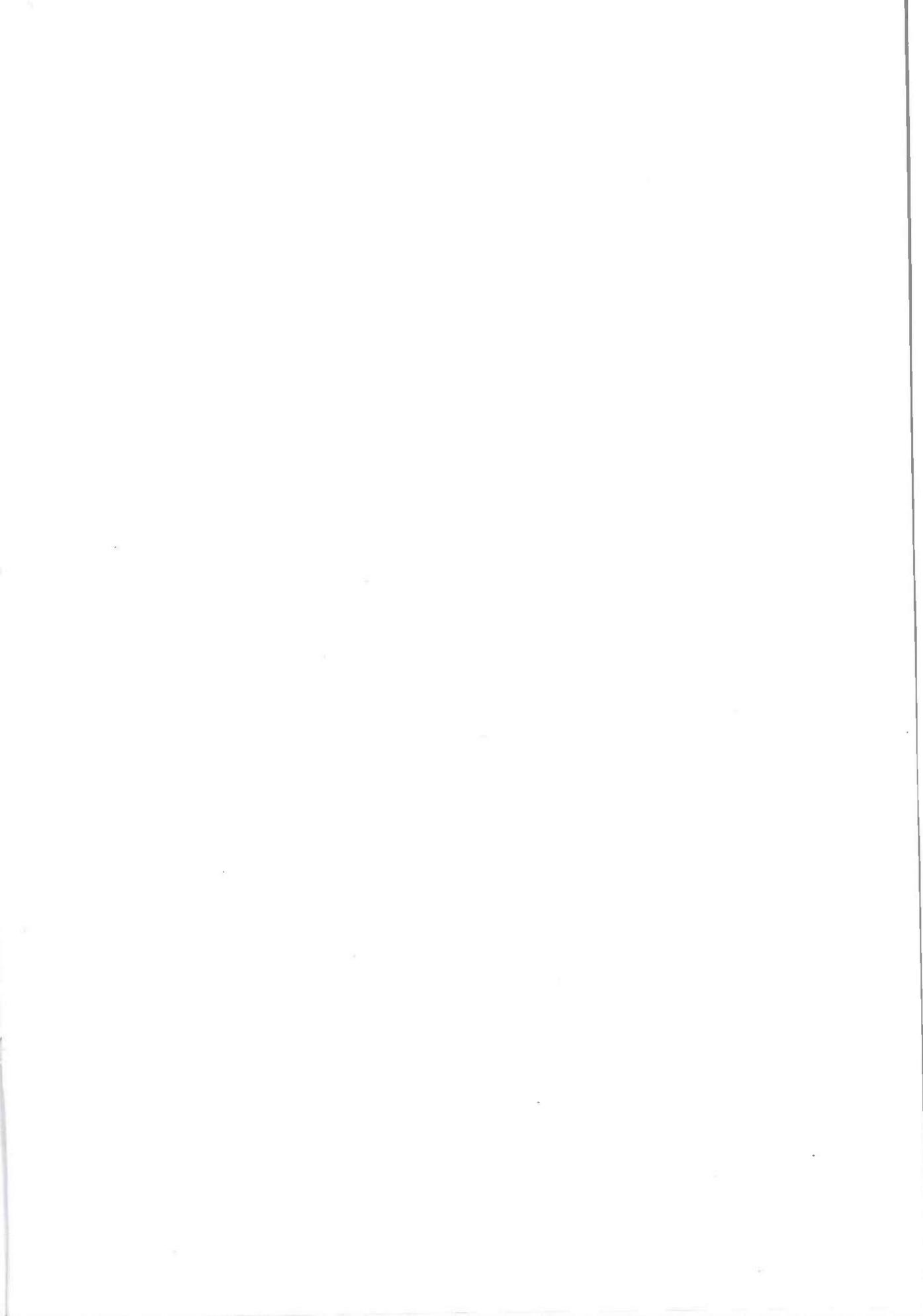
- Singer, M. F. (1982). SINEs and LINEs: Highly repeated short and long interspersed repeat sequences in mammalian genomes. *Cell* **28**: 433-434.
- Skarpeid, H.J., Kvaal, K. y Hildrum, K.I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. *Electrophoresis*, **19(18)**: 3103-3109.
- Skeritt, J.H. y Hill, A.S. (1990). Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassay for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 1771-1778.
- Slattery, W.J. y Sinclair, A.J. (1983). Differentiation of meat according to species by electrophoretic separation of muscle lactate deshydrogenase, esterase isoenzymes and isoelectric focussing of soluble muscle proteins. *Aust. Vet. J.*, **60**: 47-51.
- Smit, A.F.A. y Riggs, A.D. (1995). MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation. *Nucleic Acids Research*, **23**: 98-102.
- Soller, M. (1990). Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. *Journal of Dairy Science*, **73**: 2628-2646.
- Sorensen, S.H., Norén, O., Sjöström, H. y Danielsen, E.M. (1982). Amphiphilic pig intestinal microvillus maltase/glucoamylase. Structure and specificity. *Eur. J. Biochem.*, **126**: 559-568.

- Soteriou, B., Fisher, R.A., Khan, I.M., Kessling, A.M., Anchard, L.C. y Buluwela, L. (1995). Conserved gene sequences for species identification: Pcr analysis of the 3' UTR of the SON gene distinguishes human and other mammalian DNAs. *Forensic Sci. Int.*, **73 (3)**: 171-181.
- Spelman, R. y Bovenhuis, H. (1998). Genetic response from marker assisted selection in an outbred population for different marker bracket sizes and with two identified quantitative trait loci. *Genetics*, **148 (3)**: 1389-1396.
- Srivastava, P.K. y Old, L.J. (1988). Individually distinct transplantation antigens of chemically induced mouse tumors. *Immunol. Today*, **9 (3)**: 78-83.
- Styer, L. (1996). Metabolismo de los ácidos grasos. En: Bioquímica. 4ª Edición. Ed. Reverte.
- Swart, K.S. y Wilks, C.R. (1982). An immunodiffusion method for the identification of the species of origin of meat samples. *Aust. Vet. J.*, **59**:21-22.
- Takai, T., Yokoyama, C., Wada, K. y Tanabe, T. (1988). Primary structure of chicken liver acetyl-CoA carboxylase deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.*, **263 (6)**: 2651-2657.
- Tang, J.Q., Korab-Laskowska, M., Jarnik, M., Cardinal, G., Vanasse, M., Melacon, S.B. y Labuda, D. (1995). Alu-PCR combined with non-Alu primers reveals multiple polymorphic loci. *Mamm. Genome*, **6**: 345-349
- Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G. y Battaglia, P.A. (1998). Detection of Bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine derived materials. *J.Food Prot.*, **61 (5)**: 513-518.

- Thampy, K.G. (1989). Formation of malonyl-CoA in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J. Biol Chem.*, **264 (30)**: 17631-17634.
- Travers, M.T. y Barber, M.C. (1999). Insulin-glucocorticoid interactions in the regulation of acetyl-CoA carboxylase-Alpha transcript diversity in ovine adipose tissue. *J.Mol. Endocrinol.*, **22 (1)**: 71-79.
- Trumble, G.E., Smith, M.A. y Winder, W.W. (1995). Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *Eur. J. Biochem.*, **231 (1)**: 192-198.
- Turin, L. y Bonomi, F. (1994). Immunochemical detection of ovalbumin in dairy-based foods. *J.Sci. Food Agric.*, **64**: 39-45.
- Unseld, M., Beyermann, B., Brandt, P. y Hiesel, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Meth. Appl.*, **4**:241-243.
- Urbanke, W., Luf, W. y Brandl, E. (1992). Use of HPLC for control of the adulteration of milk and milk products of different species. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **195**: 137-142.
- Vaiman, D, Osta, R., Mercier, D., Grohs, C. Y Levéziel, H. (1992). Characterization of new bovine dinucleotide repeats. *Anim. Genet.*, **23 (6)**: 537-541
- Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. y Brignon, P. (1999). Real time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.*, **42 (12)**:5261-5266.

- Villanueva, B., de la Reguera, P.F. y Pinto, M. (1988). Application of linear discriminant analysis to the detection and quantification of adulteration of milk fat. *Agro. Sur.*, **16 (1)**: 47-52.
- Vitadello, M., Colpo, P. y Gorza, L. (1998). Rabbit cardiac and skeletal myocytes differ in constitutive and inducible expression of the glucose-regulated protein GRP94. *Biochem. J.*, **332**: 351-359.
- Wang, L., Yu, T.P., Tuggle, C.K., Liu, H.C. y Rothschild, M.F. (1998). A directed search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *J. Anim. Sci.*, **76 (10)**: 2560-2567.
- Weber, J.L. y May, P.E. (1989). Abundant class of DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American J. Hum. Genet.*, **44**: 388-396.
- Weiner, A.M., Deininger, P.L. y Efstratiadis, A. (1986). Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transportable elements generated by the reverse flow genetic information. *Ann. Rev. Bioch.*, **55**: 631-661.
- Weiner, A.M., Deininger, P.L. y Efstratiadis, A. (1986). Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transportable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann. Rev. Bioch.*, **55**: 631-661.
- Whittaker, R.G., Spencer, T.L. y Copland, J.W. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for meat species testing. *Austr. Vet. J.*, **59**: 125.
- Whittaker, R.G., Spencer, T.L. y Copland, J.W. (1983). An enzyme-linked immunosorbent assay for species identification of raw meat. *J. Sci. Food Agric.*, **34**: 1143-1148.

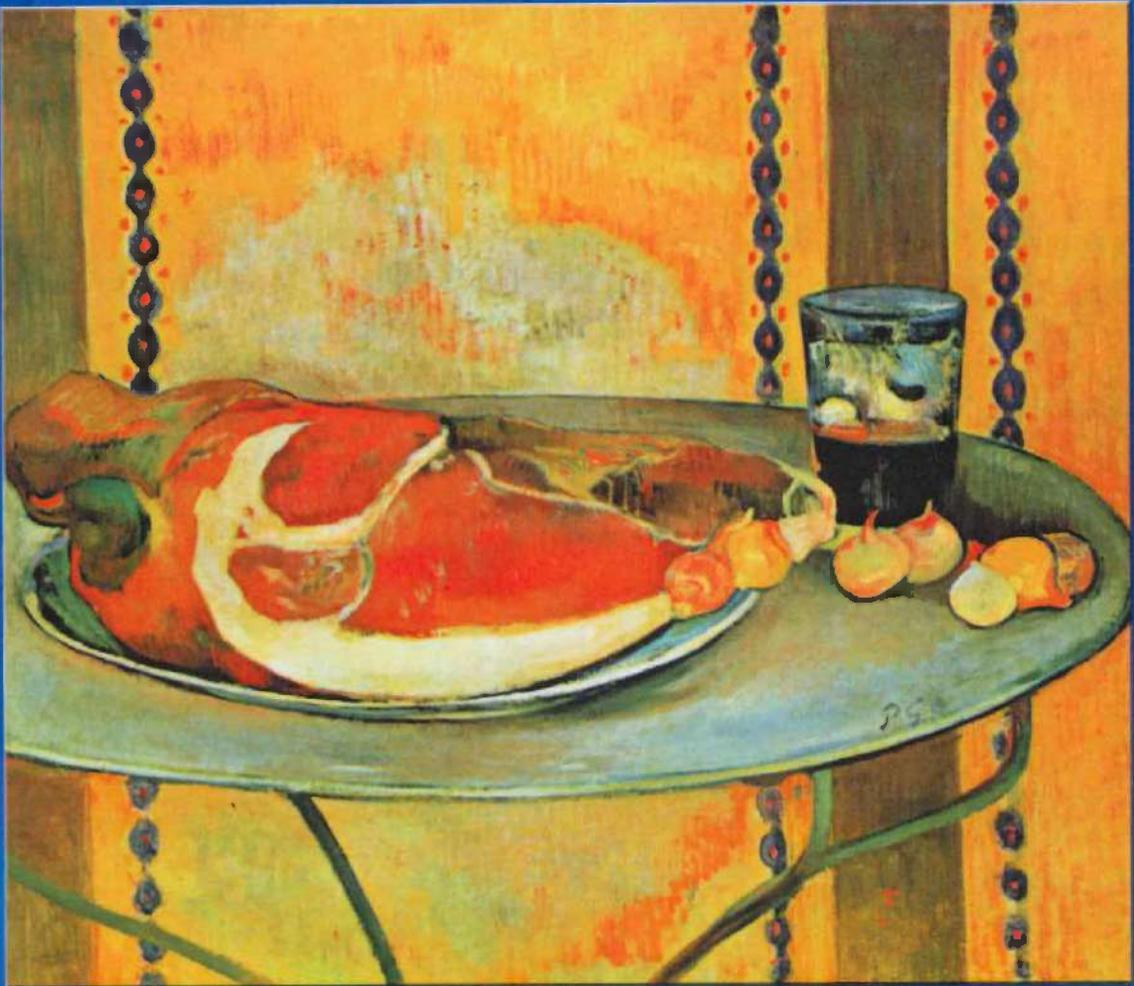
- Widmer, J., Fassihi, K.S., Schlichter, S.C., Wheeler, K.S., Crute, B.E., King, N., Nutile-McMenemy, N., Noll, W.W., Daniel, S., Ha, J., Kim, K.H. y Witters, A. (1996). Identification of a second human acetyl-CoA carboxylase gene. *Biochem. J.*, **316**: 915-922.
- Wilkie, P.J., Paszek, A.A., Beattie, C.W., Alexander, L.J., Wheeler, M.B. y Schook, L.B. (1999). A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. *Mamm. Genome*, **10 (6)**: 573-578.
- Winder, W.W. (1998). Intramuscular mechanisms regulating fatty acid oxidation during exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **441**:239-248.
- Wintero, A.K., Thomsen, P.D. y Davies, W. (1990). A comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immuno-electrophoresis and Isoelectric Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Sci.*, **27**: 75-85.
- Wooden, S.K. y Lee, A.S. (1992). Comparisson of the genomics organizations of the rat grp78 and hsc73 gene and their evolutionary implications. *DNA Sequence*, **3**: 41-48.
- Yerle, M., Echard, G., Robic, A., Mairal, A., Dubut-Fontana, C., Riquet, J., Pinton, P., Milan, D.m Lahbib-Mansais, Y y Gellin, J. (1996). A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet.*, **71**: 68-76.
- Younes, N.A. y Soliman, M.A. (1987). Adulteration of butterfat: sterol composition. *Grasas y Aceites*, **38 (6)**: 372-374.
- Zehner, R., Zimmermann, S. y Mebs, D. (1998). RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int. J. Legal Med.*, **111(6)**: 223-227.



Universidad de Zaragoza Biblioteca



3210440714



\*004654\*