



**SESIÓN DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS
XXXVII
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS - 2016**



Optimización de condiciones de amplificación para la identificación de bovinos, búfalos, ovinos y caprinos por PCR-RFLP

Sosa F. E. *, Sandoval G. L., Almirón E. C., De Biasio M. B.

Servicio Veterinario de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE.
*fp_26_05@hotmail.com

Resumen

El fraude alimentario se multiplica en todos los niveles, desde etiquetas falsificadas a comida adulterada. Títulos de noticias como “Cierran una pizzería que rellenaba empanadas con carne de perro” (Bs. As), “Una familia vendía carne de caballo por vacuna” (Stgo. Del Est.), “Venden hamburguesas con carne de caballo” (Bs. As.), son los que nos revelan que no es una realidad ajena a nuestro presente. Pero, para que se pueda hablar de fraude alimentario hace falta que se verifique una “alteración intencionada de las características de un producto de alimentación de forma ilícita y con fines lucrativos” y es entonces cuando la Biología Molecular adquiere gran importancia. Con el objeto de contribuir a solucionar situaciones problemáticas de este tipo, se puso en marcha en el SVBM, la optimización de la técnica de PCR-RFLP para la amplificación de un fragmento común del gen mitocondrial de ARNr12S y posterior digestión con las enzimas HhaI, ApoI y AluI. Se extrajo ADN de cada especie, a partir de muestras de sangre y se realizó la amplificación por PCR (Kocher *et al.* en 1989) en un volumen final de 50µl, conteniendo: 1X de Buffer de PCR, 1,5mM MgCl₂; 0,2µM de cada cebador; 0,2mM de una mezcla equimolecular de dNTPs y 2,5U de Taq ADN polimerasa. En todos los casos se utilizaron 3µl de ADN e igual volumen de agua para el control negativo de amplificación. Las mezclas se sometieron a las siguientes condiciones térmicas de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, pegado de cebadores a 58°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 1,5 min y extensión final a 72°C durante 5 min, finalizando con incubación a 4°. Los resultados fueron analizados sometiendo los productos a electroforesis en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV y todas las muestras reflejaron uniformemente un producto de amplificación de 456pb correspondiente al amplicón previsto. Para finalizar, se realizó la RFLP usando 10µl de los productos de amplificación obtenidos anteriormente para la digestión con las enzimas de restricción AluI, ApoI y HhaI (en tubos separados por especie y por enzima) en un volumen final de 20µl, conteniendo las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de buffer de restricción, 2µg de albúmina sérica bovina y 5 unidades de cada enzima de restricción. La incubación se realizó a 37°C (en el caso de Alu I y Hha I) y 50°C (para Apo I) durante 2 horas y como resultado de la digestión enzimática, el tamaño de los fragmentos obtenidos luego de la electroforesis en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV fue con AluI: 359 y 97pb en bovinos; 456pb en búfalos, 246 y 210pb en ovinos y caprinos; con HhaI: 247 y 209pb en búfalos y 456pb en bovinos, caprinos y ovinos y con ApoI: 329 y 127pb en ovinos y 456pb en bovinos, búfalos y caprinos.

Palabras clave: ADN, alimentos, fraude.