
Area de Beca: CA - Cs. Agropecuarias

Título del Trabajo: OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AVES Y FELINOS POR PCR.

Autores: SOSA, FABIANA E. - SANDOVAL, GLADIS L. - DE BIASIO, MARIA B.

E-mail de Contacto: fp_26_05@hotmail.com

Teléfono:

Tipo de Beca: UNNE Pregrado

Resolución N°: 994/14 C.S

Período: 01/03/2015 - 29/02/2016

Proyecto Acreditado: Beca de pregrado: "Implementación de técnicas moleculares para la identificación de especies animales" Res.994/14CS. Programa marco: "Alternativas para la producción de carnes de calidad en el noreste argentino", Res. 873/13-CS (2014-2017).

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Veterinarias

Palabras Claves: ADN - Calidad Alimentaria - Biología molecular

Resumen:

Entre múltiples aplicaciones, las técnicas genéticas han demostrado ser de gran utilidad para resolver la identificación de los individuos y para la determinación de la especie a la que pertenecen. Se ha probado que es posible extraer ADN de alimentos procesados, pudiendo identificarse sus componentes, evitando así el reemplazo de una materia prima por otra. Con el objeto de contribuir con la resolución de situaciones problemáticas vinculadas a la identificación de especies animales relacionada a calidad alimentaria, sanidad y producción animal, aspectos bromatológicos y salud pública, se realizó la extracción de muestras de células bucales en dos pollos por medio de hisopos, rotando los mismos en la cavidad bucal durante un lapso de tiempo de entre 7-10 segundos. Los hisopos obtenidos se conservaron en tubos Eppendorf a -20°C para su posterior uso. Asimismo, se extrajo sangre a una gata utilizando EDTA (ácido etilenaminotetracético) como anticoagulante y se conservó la muestra -20°C hasta su utilización. Se extrajo ADN de las muestras, utilizando el detergente CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio) para la digestión celular. Previo a la incubación con detergente, se provocó lisis osmótica de los glóbulos rojos en la muestra de sangre. Se purificaron los ácidos nucleicos por incubación con cloroformo:alcohol isoamílico y posterior precipitación con isopropanol. El precipitado se lavó con etanol 70%, resuspendiéndolo luego en agua destilada y conservándose a -20°C hasta su utilización. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa 2% utilizando buffer TBE 1x y conteniendo bromuro de etidio. La visualización se realizó por transiluminación UV. Tanto para el caso de aves como felinos las condiciones con las que se obtuvieron los mejores resultados (bandas electroforéticas nítidas y de buena intensidad) fueron las reacciones de PCR de 25µl de volumen final conteniendo agua, Buffer de PCR (Promega) 1x, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs (Promega) 0,2 mM, Primers Fw y Rew 0,2 µM de cada uno y 1U de Go-Taq (Promega). Las condiciones térmicas resultaron en: desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto seguido de 30 ciclos consistentes en desnaturalización a 95°C 30", annealing de primers a 55°C 30" y extensión a 72°C 30" y luego una extensión final a 72°C 5 minutos e incubación a 4°C. En el revelado se observaron bandas de amplificación específicas de 197 y 98pb para aves y felinos respectivamente. Se logró así, poner a punto dos PCR para la detección de especies animales utilizando los oligonucleótidos cebadores descritos por Walker J.A. *et al.* (2004), en hisopado de cavidad bucofaringea de pollos parrilleros y en sangre de gato doméstico, en el SVBM-FCV-UNNE, quedando disponibles para ser utilizadas en proyectos de investigación o en muestras que arriben a dicho Servicio.