



XXII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-015 (ID: 393)

Autor: Sosa, Fabiana Evangelina

Título: Puesta a punto de condiciones de amplificación para la identificación de bovinos, búfalos y ovinos por PCR-RFLP

Director:

Palabras clave: ADN,PCR-RFLP,ALIMENTOS

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Cyt - Pregrado

Periodo: 01/03/2015 al 29/02/2016

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Veterinarias

Proyecto: (13CB02) Estudios bioquímico-moleculares aplicables a la producción y sanidad de carnes.

Resumen:

Para establecer la autenticidad de un alimento, es necesario demostrar que éste se comercializa bajo la denominación a la que realmente corresponde, así como que contiene las materias primas y los porcentajes de ingredientes que se declaran en el etiquetado. Actualmente, por el estudio de ADN nuclear o mitocondrial, se puede determinar de manera más exacta la/s especie/s de origen de una muestra e identificar todos los productos que llegan al consumidor, aunque ya estén procesados. El objetivo del presente trabajo consistió en optimizar las condiciones de amplificación y restricción enzimática con las enzimas Alul y Hhal para identificar presencia de ADN bovino, bubalino y ovino por PCR-RFLP, analizando un fragmento del gen mitocondrial de ARNr 12S. La puesta a punto se llevó a cabo con muestras de sangre de dichas especies pero, con el objeto de contribuir a solucionar situaciones problemáticas como las anteriormente descritas, los protocolos optimizados en el Servicio Veterinario de Biología Molecular de la FCV-UNNE permitirán a futuro la identificación de las especies mencionadas en diferentes productos alimenticios derivados de las mismas. Para ello, se produjo la lisis osmótica de glóbulos rojos en las muestras, seguida de la eliminación del sobrenadante contenido el grupo Hem (inhibidor de la enzima Taq ADN polimerasa) y luego la digestión celular de glóbulos blancos con el detergente CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio), continuada por la purificación de ácidos nucleicos mediante incubación con cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación posterior con isopropanol. El precipitado se lavó con etanol 70% y luego se resuspendió en agua destilada, conservándose a -20°C hasta su utilización. La amplificación por PCR del gen mitocondrial de ARNr 12S se realizó siguiendo el proceso descripto por Kocher et al. 1989 en un volumen final de 50 μ l contenido 1X de Buffer de PCR, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μ M de cada oligonucleótido cebador, 0,2mM de una mezcla equimolecular de dNTP y 2,5U de Taq ADN polimerasa. En todos los casos se utilizaron 3 μ l de ADN de cada especie en estudio, e igual volumen de agua como control negativo de amplificación. Las mezclas de reacción así preparadas se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación: desnaturación inicial a 95°C durante 2 min, seguida de 30 ciclos consistentes en desnaturación 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°. La obtención de amplicones se verificó por electroforesis en gel de agarosa 2,0% teñido con bromuro de etidio, comprobándose que todas las muestras produjeron uniformemente un producto de amplificación compatible con el fragmento de 456 pb correspondiente al gen de ARNr mt. Luego, usando 10 μ l de cada uno de los amplicones, se realizó la digestión con las enzimas de restricción Alul y Hhal en tubos separados (por especie y por enzima), en un volumen final de 20 μ l, contenido las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de buffer de restricción, 2 μ g de albúmina sérica bovina y 5 unidades de cada enzima de restricción. La incubación se realizó a 37°C durante 2 horas. Los resultados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizados por transiluminación UV, observándose fragmentos de 247 pb y 209 pb en Búfalos con la enzima Hhal, y 246 pb y 210 pb en Ovinos, 359 pb y 97 pb en Bovinos con la enzima Alul.