

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



TESIS DOCTORAL

**Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios
mediante PCR en tiempo real**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María López Andreo

Director

Antonio Puyet Catalina

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES
EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS MEDIANTE PCR EN
TIEMPO REAL**

TESIS DOCTORAL

MARÍA LÓPEZ ANDREO

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad

Complutense de Madrid

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

D. Antonio Puyet Catalina, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: *Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real* que presenta la licenciada en Bioquímica D^a. María López Andreo ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid, bajo su supervisión, y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo como director de la mencionada tesis el presente certificado autorizando su presentación.

En Madrid, a 27 de septiembre de 2012

Fdo. Prof. Dr. Antonio Puyet Catalina

AGRADECIMIENTOS

Unas veces infranqueable muralla y otras, franca oportunidad; unas, ocasión para la fragilidad como otras, dilema para el afán de superación; unas, fuente de motivación y otras, agujero negro del fracaso. Y es que quizá existan mil formas de considerar y de lograr solucionar la desafiante apuesta que hace tanto tiempo empecé.

Al igual que soñar, reír, llorar, suspirar, gritar, lamentarse o regocijarse son razones y estados distintos por los que inevitablemente la ruleta rusa ha pasado hasta zanjar lo que parecía una interminable partida. Y, lo único que me queda claro, es que con el paso del tiempo es más complicado contar los pasos dados para conquistarla.

Recuerdo los principios tipo crupier, ateniéndome exclusivamente a las reglas, realizando un trabajo mecánico, sin ninguna capacidad de iniciativa, avanzando en torpes movimientos en una sola dirección, cuando como si de un gurú se tratase, mi director Antonio Puyet, me animó a matricularme y a comenzar.

Y poco a poco, me viene a la cabeza cómo dejé de ser esa novata, aunque no puedo precisar el instante en el que aprendí a mover mis manos con extraña facilidad, comprendiendo que no siempre los caminos rectos son los más idóneos para alcanzar un destino, logrando cambiar, sin duda gracias a mis compañeros Susi, Gemita y Rafa, el peso del esfuerzo que deja el trabajo por la sensación de gloria entre las manos. De este modo resultó fácil que, poco a poco, un estilo de vida de trabajo impregnado por el compañerismo, se colara en mi forma de pensar. Y de la misma forma, lentamente, el lenguaje de primers, sondas y demás, pasó a ser una forma de comunicarnos.

Probablemente, pueda destacar en la memoria las ocasiones, en las que publicar unos resultados, exigía una dosis de fe y convicción extra, cuando asimilaba con callos en los dedos que la vida no es un cuento de hadas y que la llave universal es el esfuerzo...y la suerte. De ella se dice que sólo favorece a las mentes preparadas (Homero), pero allí estaba Antonio Puyet demostrando su agudeza y sacándome de todas las encrucijadas posibles.

Y ahora que la partida llega a su fin, no puedo resolverla sin recordar a los que más me apoyaron, mis padres, mi hermano, mi compañero Javi y mis amigas Patricia Marín y Ruth Gil, que con su imprescindible insistencia y ejemplo de tantos trofeos, me echaron una mano para derrotar a esos rivales menores que aún no me creo hayan desaparecido de mi vida.

Sólo me queda agradecer desde lo más profundo a todos los que forman parte del Departamento (el Director Juan Manuel Bautista, los profesores Amalia Díez, María Milagrosa Gállego, Amando Garrido y tantos otros) así como a las instituciones que contribuyeron o que me ayudaron a no rendirme y a conseguir dar por fin jaque mate.

**“Si uno comienza con certezas, terminará con dudas;
más si se conforma en comenzar con dudas, llegará a
terminar con certezas”**

Francis Bacon (1521-1626)

**“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo,
a dudar y a ser ignorante”**

Lévi-Strauss (1908-2009)

**“Loda sea la duda. Os aconsejo que saludéis
serenamente y con respeto
a aquel que pesa vuestra palabra como una moneda
falsa (...)**

**Oh hermoso gesto de sacudir la cabeza
ante la indiscutible verdad
Oh valeroso médico que cura
al enfermo ya desahuciado”**

Loa a la duda (1933)

Bertolt Brecht (1898-1956)

INDICE

1. Resumen	17
2. Introducción	9
2.1 COMPOSICIÓN DE ALIMENTOS, NORMAS DE ETIQUETADO Y TRAZABILIDAD	11
2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN ALIMENTOS	14
2.2.1 <i>Sistemas basados en proteínas</i>	14
2.2.1.1 Métodos inmunológicos	15
2.2.1.2 Métodos electroforéticos	17
2.2.1.3 Inmunolectroforesis	18
2.2.1.4 Aplicación de la tecnología proteómica	18
2.2.2 <i>Sistemas basados en el análisis de ácidos nucleicos</i>	19
2.2.2.1 PCR-Secuenciación	21
2.2.2.2 Digestión con enzimas de restricción: PCR-RFLP	22
2.2.2.3 Polimorfismos de conformación de cadena simple: PCR-SSCP	23
2.2.2.4 PCR en chips: arrays y microarrays de DNA	23
2.2.2.5 Otros métodos genéticos: repeticiones en tándem, AFLP y RAPD.	24
2.2.2.6 Amplificación específica de fragmentos de PCR.	25
2.2.3 <i>Otros métodos</i>	26
2.3 DISEÑO DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE DNA	28
2.3.1 <i>Diseño de cebadores y sondas</i>	30
2.3.2 <i>Factores de la reacción de polimerasa en cadena a considerar en las aplicaciones de identificación de especies</i>	31
2.3.2.1 Extracción de DNA: material de origen, método de extracción, cantidad requerida y calidad	31
2.3.2.2 Componentes de la reacción	32
2.3.2.3 PCR múltiple	35
2.3.3 <i>Utilización de sondas fluorescentes para PCR en tiempo real</i>	35
2.3.3.1 Agentes intercalantes en la molécula de DNA	38
2.3.3.2 Sondas de hidrólisis	39
2.3.3.3 Sondas de hibridación en tándem	41
2.3.3.4 Sondas de horquilla (Molecular Beacons)	42
2.4 CUANTIFICACIÓN	43
2.4.1 <i>Cuantificación absoluta</i>	45
2.4.2 <i>Cuantificación relativa</i>	47
3. Justificación y Objetivos	51
4. Trabajos experimentales	55
IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF SPECIES IN COMPLEX DNA MIXTURES BY REAL-TIME PCR.	57

EVALUATION OF POST-PCR MELTING TEMPERATURE ANALYSIS FOR MEAT SPECIES IDENTIFICATION IN MIXED DNA SAMPLES.....	77
DETECTION AND QUANTITATION OF MEAT SPECIES BY qPCR IN HEAT-PROCESSED FOOD CONTAINING HIGHLY FRAGMENTED DNA.....	91
DETECTION OF MANDARINE IN ORANGE JUICE BY SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM qPCR ASSAY.....	107
5. Discusión General	123
5.1 OPTIMIZACIÓN DE DETECTORES Y REDUCCIÓN DE COSTES DE ENSAYO	125
5.2 USO DE MATERIALES DE REFERENCIA PARA NORMALIZACIÓN DE RESULTADOS.....	127
5.3 DIFERENCIACIÓN ENTRE ESPECIES FILOGENÉTICAMENTE PRÓXIMAS	130
5.4 DETECCIÓN FRENTE A CUANTIFICACIÓN	131
6. Conclusiones	135
7. Bibliografía	139

ABREVIATURAS

- **AFLP**: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism)
- **CBOL**: The Consortium for the Barcode of Life
- **C_T**: Número de ciclo en el cual la muestra alcanza un nivel de fluorescencia fijado (del inglés cycle threshold)
- **HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés High-Performance Liquid Chromatography)
- **DHPLC**: Cromatografía líquida desnaturante de alto rendimiento (del inglés Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)
- **E**: Eficiencia de la reacción de PCR o el número de copias medio de producto de reacción por ciclo de PCR
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético
- **EEB**: Encefalopatía Espongiforme Bovina
- **ELISA**: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del acrónimo inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- **FC**: Zumo procedente de concentrado
- **FINS**: Metodología que identifica la especie de la que procede una muestra mediante el estudio comparativo de su secuencia con la de otras especies (del inglés Forensically Informative Nucleotide Sequencing)
- **FRET**: Fenómeno de la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia
- **FTIR**: Transformada de Fourier (del inglés Fourier transform infrared)
- **GC**: Cromatografía de gases
- **GC-MS**: Cromatografía de gases-espectrometría de masas
- **HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés High-Performance Liquid Chromatography)
- **IEF**: Isoelectroenfoque
- **IMIDA**: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
- **LC-MS/ MS**: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
- **LINES**: Retrotransposones de DNA nuclear con secuencias repetidas largas (del inglés Long Interspersed Nuclear Elements)
- **MALDI-TOF**: desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a detector de iones (de sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time Of Flight)
- **MBM**: Piensos o harinas de carne y hueso (del inglés Meat and Bone Meal)
- **MGB**: Afinidad por el surco menor del DNA (del inglés Minor Groove Binding)
- **Molecular Beacons**: Sondas con estructura tipo horquilla
- **NFC**: Zumo no procedente de concentrado (en inglés juice not from concentrate)
- **NIR**: Espectroscopía infrarroja cercana (del inglés Near-Infrared Spectroscopy)
- **NTD**: Reacción control sin DNA diana (del inglés non target DNA control)
- **OGM**: Organismos genéticamente modificados
- **PAGE-SDS** : Electroforesis realizada en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
- **pb**: Par de bases
- **PCR**: Reacción de amplificación de la polimerasa en cadena (del inglés polymerase chain reaction)
- **PCR-RFLP**: Reacción de amplificación de la polimerasa en cadena seguida de digestión de los productos de DNA con enzimas de restricción (del inglés Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism)
- **PCR-SSCP**: Reacción de amplificación de la polimerasa en cadena seguida del análisis de polimorfismos de conformaciones monocatenarias (del inglés Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism)
- **qPCR**: PCR en tiempo real (del inglés quantitative polymerase chain reaction)
- **QUID**: Etiquetado cuantitativo de ingredientes (del inglés QUAntitative Ingredient Declaration)
- **RAPD**: DNA polimórfico amplificado al azar (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA analysis)
- **SDS**: Dodecil sulfato de sodio (en inglés Sodium Dodecil Sulfate)

- **SINES**: Secuencias repetidas cortas en DNA nuclear (del inglés Short Interspersed Nuclear Elements)
- **SNIF-NMR**[®]: Técnica que utiliza la resonancia magnética nuclear logrando la identificación mediante comparación de perfiles atómicos (del inglés Site-specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance)
- **SNP**: Mutaciones puntuales que afectan a un solo nucleótido
- **STR**: DNA satélite (del inglés short tandem repeats)



1. Resumen



La verificación de las especies animales y vegetales presentes en productos alimenticios mediante métodos analíticos es una necesidad creciente para la industria alimentaria y los organismos de control oficiales. La detección de sustituciones de especies de alto valor por otras de precio inferior en productos alimenticios, la verificación de los porcentajes de cada especie declarados en el etiquetado y la detección de especies no autorizadas son, entre otros, algunas de las aplicaciones de los métodos moleculares de identificación y cuantificación de especies en alimentos. En esta tesis se han abordado diferentes aspectos de las técnicas para la detección y cuantificación de especies basadas en la amplificación en tiempo real de secuencias de DNA específicas. En primer lugar, se ha diseñado y ensayado un método basado en sondas TaqMan[®] MGB (Minor Groove Binding) genéricas y cebadores específicos para DNA mitocondrial de varias especies cárnicas: vaca (*Bos taurus*), cerdo (*Sus scrofa*), pollo (*Gallus gallus*) y pavo (*Meleagris gallopavo*). Además, se propone un nuevo método de cálculo que permite detectar la presencia de DNA de otras especies eucarióticas en la muestra cuando se encuentran en porcentajes mayores del 20%. Este amplicón general para organismos eucariotas también se utiliza para normalizar los valores obtenidos con los amplicones específicos, posibilitando la cuantificación de muestras que contienen mezclas de materiales procedentes de diferentes especies, siguiendo un método basado en el número de ciclo en el que se alcanza una fluorescencia umbral. Puesto que el procesado de los alimentos es algo habitualmente usado con objeto de conservar y preparar los alimentos, en un trabajo experimental posterior se ha estudiado la forma en la que el tratamiento de calor y el tiempo de exposición pueden afectar al DNA y llegar a ser una causa de error en los análisis cualitativos y cuantitativos. Los detectores diseñados para vaca y cerdo se utilizaron en este caso para verificar el contenido de cada especie en mezclas de carne sometidas a tratamientos con calor. En una segunda aproximación, se diseñaron nuevos detectores para analizar la fragmentación de la cadena DNA en las carnes tratadas a partir de las amplificaciones obtenidas con cebadores separados en 95, 250 y 350 pares de bases en muestras de carne sometidas a diversos tratamientos de cocción y esterilización. Comparando los resultados con los obtenidos utilizando DNA tratado con diferentes concentraciones de DNasa I fue posible establecer una correlación entre los tratamientos térmicos y el grado de fragmentación del DNA.

En esta tesis se presentan también los resultados obtenidos de la aplicación de métodos de PCR en tiempo real con SYBR[®] Green para la identificación de DNA en mezclas complejas. Se evaluó la capacidad de detección y cuantificación de DNA procedente de especies comerciales comunes: vaca (*Bos taurus*) y cerdo (*Sus scrofa*), frente a dos especies no comunes o exóticas: caballo (*Equus equus*) y canguro (*Macropus robustus*), en productos alimenticios, mediante el análisis de las curvas de fusión de los productos de la reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real con reacciones uniplex y múltiplex usando SYBR[®] Green. En las condiciones ensayadas, el área bajo los picos observados en las curvas de fusión de las reacciones dúplex no es proporcional a las

cantidades relativas de cada especie en la mezcla lo cual impide el uso de sistemas múltiplex para aplicaciones en las que sea necesario obtener datos cuantitativos. Sin embargo, los resultados obtenidos con SYBR[®] Green en reacciones uniplex y dúplex con el DNA de las especies por separado, son equiparables a los resultados logrados mediante el uso de sondas de hidrólisis fluorescentes, demostrando que esta aproximación más sencilla y económica puede ser adecuada para algunas aplicaciones analíticas.

Finalmente se ha abordado el problema de la discriminación de especies muy próximas filogenéticamente o variedades dentro de una misma especie, utilizando como ejemplo el caso de la diferenciación de naranja y mandarina en zumos. Se propone un método de detección/cuantificación, basado en la utilización de un juego de cebadores comunes para las dos especies y dos sondas TaqMan[®] MGB que se diferencian en una sola base, correspondiente al polimorfismo que identifica cada especie. Los resultados muestran que el método de qPCR es válido al permitir establecer un límite de detección útil para diferenciar entre ingrediente y contaminación, si bien es necesario que el procedimiento de análisis vaya acompañado de suficientes reacciones de control con materiales de referencia para evitar errores de cuantificación debido a la variabilidad asociada a las medidas.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis resaltan la importancia del uso de materiales de referencia adaptados a la matriz a analizar, tanto en aplicaciones cualitativas como cuantitativas. Esta estrategia se usa en dos de los trabajos presentados. A diferencia de otras propuestas que requieren la elaboración de una colección de muestras de referencia con distintas proporciones de la especie a detectar en la mezcla, en estos trabajos se muestra que es posible obtener datos fiables utilizando una única muestra de referencia con contenido conocido de las especies a analizar. Esta aproximación puede simplificar la puesta a punto y validación de métodos de análisis particularizados para cada tipo de matriz, facilitando la introducción de los sistemas de identificación genética en alimentos.



2. Introducción

2.1 Composición de alimentos, normas de etiquetado y trazabilidad

La búsqueda de métodos analíticos más exactos y sensibles para determinar el origen y composición de productos destinados a la alimentación humana y animal se ha incrementado de forma importante en los últimos años. Esta tendencia se justifica por diversos intereses, entre los que cabe destacar los económicos, éticos y los de salud pública. La sustitución fraudulenta de especies de alto valor económico por otras más baratas, la fabricación de productos con menor cantidad de especie que la declarada, la inclusión de carne en productos destinados a vegetarianos, la presencia de especies no permitidas a grupos religiosos así como el riesgo de salud asociado a comida no apta para el consumo ha impulsado establecimiento de mayores controles en la cadena de producción y comercialización de productos para alimentación.

El control del contenido en los productos para alimentación se puede realizar a dos niveles:

- Utilizando métodos de documentación y etiquetado de los productos e ingredientes desde su origen y a lo largo de toda la cadena de fabricación y comercialización, lo cual ha llevado al desarrollo de toda una categoría de procedimientos que se engloba bajo el término de “trazabilidad”.

- Mediante métodos analíticos que permiten la identificación y cuantificación de los componentes utilizados en la elaboración de alimentos, desde las materias primas hasta el producto acabado.

La legislación europea actual aborda ambos aspectos, requiriendo la aplicación de sistemas que permitan trazar documentalmente el origen de los productos comercializados, al mismo tiempo que se aumenta el número de procedimientos de ensayo estandarizados para el análisis de alimentos.

Estas necesidades de trazabilidad y análisis se han visto impulsadas sobre todo por dos situaciones concretas, surgidas en medio de la controversia sobre medio ambiente y los riesgos de salud, por la comercialización de alimentos procedentes de cultivos transgénicos en 1994 (Levidow and Boschert, 2008) y la emergencia de nuevos problemas de salud pública tales como la crisis de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, entre finales del año 1994 y principios del 1995, derivada del consumo de carne procedente de animales alimentados con piensos o harinas de carne y hueso (MBMs) que contenían proteína animal (Bradley, 2003).

En el caso de los productos transgénicos ha sido necesario elaborar una serie de protocolos estandarizados para la discriminación entre los autorizados y no autorizados, que permita su detección incluso en alimentos procesados. Además, en la unión europea la obligación de que el contenido en material transgénico figure en el etiquetado si éste sobrepasa una proporción determinada (actualmente el 0.9%) ha hecho necesario el

desarrollo de métodos de ensayo cuantitativos muy sensibles y robustos que se utilizan en los laboratorios de calidad y seguridad alimentaria (Di Pinto et al., 2008; Miraglia et al., 2004).

La variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob es una enfermedad neurodegenerativa humana claramente vinculada con la encefalopatía bovina espongiforme (EEB) transmisible del ganado. La prohibición de utilizar proteínas derivadas de animales, excepto de peces, en la alimentación animal ha controlado eficazmente el desarrollo de la epidemia de EEB (Frezza et al., 2008). Esta prohibición, impuesta por la Unión Europea en el año 2002 (European Commission, 2002) impulsó de forma importante el estudio de métodos más precisos para la identificación y cuantificación de especies en alimentos para animales, generándose la necesidad de controlar la veracidad del etiquetado en los referidos productos alimenticios mediante métodos que permitan la detección de cantidades muy pequeñas de carne de vacuno en los diferentes tipos de productos, incluso en los procesados. Así, se han propuesto distintos métodos que permiten la detección de DNA de mamífero en general, y vacuno en particular, incluso en el caso de DNA altamente degradado mediante la amplificación de fragmentos tan cortos como 66 y 76 pares de bases (pb) respectivamente (Brodmann and Moor, 2003).

En lo que concierne a las especies animales o vegetales presentes en un producto para alimentación, puede ser necesario conocer tanto su presencia como ausencia o, en su caso, la cantidad, a efectos de verificación de los valores declarados en el etiquetado (Ghovvati et al., 2009). Diversos estudios han demostrado que el etiquetado incorrecto, bien sea fortuito o intencionado, es muy frecuente tanto en productos elaborados como frescos. En un estudio realizado en 1995 mediante inmunoensayo sobre 902 productos cárnicos, se encontró que el 15% de los productos frescos y el 22% de los productos procesados contenían especies animales no declaradas en el etiquetado (Hsieh et al., 1995). En un estudio más reciente utilizando metodología similar se han detectado porcentajes incorrectos próximos al 20% del etiquetado, fundamentalmente carne de ave sustituyendo a ternera (Ayaz et al., 2006). Otro estudio independiente realizado mediante reacciones de polimerasa en cadena (PCR) múltiple sobre muestras de carne picada, salchichas y fiambre obtuvo resultados similares, detectándose casos frecuentes de presencia de carne fraudulentamente añadida en estos alimentos procesados: el 40% de las muestras de salchichas y el 30% de las muestras de fiambre se encontraban contaminadas con DNA procedente de aves de corral (Ghovvati et al., 2009). Otros estudios en diferentes países, realizados mediante análisis por inmunodifusión, también arrojan un número significativo de etiquetado erróneo, sobre todo en productos procesados o cocinados (Flores-Munguia et al., 2000), así como en piensos para animales (Dalmaso et al., 2004). Un caso particular dentro de la industria cárnica es el fraude en productos derivados de especies escasamente comercializadas, como el ciervo o jabalí, encontrándose frecuentemente DNA bovino, ovino, porcino y de ave de corral en estos productos (Zha et al., 2010). El problema del fraude y el etiquetado incorrecto puede ser aún más extenso en otros productos como la leche, en la

que es frecuente la adición de leche de vaca, de menor valor, a la de cabra, oveja o búfala, de mayor valor, para la fabricación de lácteos fermentados (Mininni et al., 2009). Tal fraude puede tener también consecuencias para la salud de los consumidores puesto que algunos compuestos de la leche bovina tienen un alto potencial alergénico. En cuanto a los productos pesqueros, la gran variedad de estas especies dificulta su reconocimiento, especialmente en el caso de alimentos procesados, exponiendo al consumidor a varios fraudes comerciales y a repercusiones en su salud. La Ley Europea obliga a indicar las especies por sus nombres comerciales específicos en los productos pesqueros frescos, pero no en los procesados, en los que se permite denominar las especies de forma genérica. Una reciente recopilación de estudios científicos sobre casos de sustitución en productos pesqueros acumula hasta veinticuatro informes afectando a una veintena de especies diferentes (Puyet and Bautista, 2009). Respecto a la autenticidad de zumos y néctares se están detectando numerosos casos de concentrados de naranja que contienen altos porcentajes de mandarina (superiores al 10%) (Esturo, 2008), lo cual, supone un fraude alimentario en España, conforme al Real decreto 1050/2003 de 1 de agosto en su parte 5, en el que se regula la obligatoriedad de indicar en la etiqueta todas las frutas utilizadas, en orden decreciente, según el volumen de los zumos o purés de frutas utilizados para elaborar el zumo. La adulteración más frecuente en el zumo de naranja es debida a la dilución con agua, ya que es enmascarada mediante la adición de azúcar, ácido cítrico, colorantes etc. Otras formas de adulteración son la adición de pulpa en vez de zumo o la de zumos y/o pulpas procedentes de otras frutas, principalmente otros cítricos. Ésta última forma de adulteración está tomando una gran relevancia debido a las fluctuaciones en la producción de naranjas en cuanto a calidad y cantidad.

Independientemente de la aplicación de criterios de trazabilidad, los organismos encargados de la salud pública y defensa del consumidor, así como los departamentos de control de calidad tanto de empresas de procesado como de comercialización de alimentos y piensos, requieren métodos analíticos más fiables que permitan verificar la composición de los productos utilizados o comercializados.

La normativa relacionada con el etiquetado de alimentos en general, tanto a nivel nacional (Real Decreto 121/2004 y 1380/2002 para productos congelados) como europeo (Reglamento Europeo (CE) 104/2000 y 2065/2001), ha ido elaborándose y modificándose de forma cada vez más exigente, a fin de asegurar la trazabilidad en toda la cadena de producción alimentaria. El Real Decreto 1334/1999, de 31 de Julio, aprobaba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios en España (Boletín Oficial del Estado, 1999). Esta norma general de etiquetado fue modificada posteriormente por el Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre (Boletín Oficial del Estado, 2004).

Un paso más para normalizar el etiquetado de los productos para el consumo lo dio el Parlamento Europeo dictaminando la implantación de una normativa común para la

declaración de ingredientes (QUID: QUantitative Ingredient Declaration), plasmado en la Directiva del Parlamento Europeo CE 13/2000, por la cual se hace necesario no sólo identificar las especies que se han utilizado para la elaboración de un determinado producto, sino también en qué cantidad está presente cada una de ellas (European Council, 2000).

La normativa sobre trazabilidad de los productos alimenticios se inició con el reglamento CE nº 178/2002 del parlamento europeo (European Council, 2002). En él, se define el concepto de trazabilidad que debe aplicarse en las industrias alimentarias como “la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, la transformación y distribución de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo”. Este concepto se aplica en el sentido de obligar al cumplimiento de estas normas de etiquetado y documentales de forma que permitan en todo momento seguir hasta su origen todos los ingredientes y aditivos, lotes, origen geográfico y empresas productoras y procesadoras, que han participado en la manufactura y expedición del producto. Para lograr esta trazabilidad se hace necesario establecer controles en la elaboración y comercialización de productos destinados al consumo. Una vez establecidas las normas y los protocolos que permitan el seguimiento exhaustivo de todos los materiales y procesos que sigue un producto desde su origen hasta su destino, y con la adecuada aplicación de los sistemas de trazabilidad documental, debería ser posible verificar la exactitud del etiquetado, tanto en productos frescos como procesados. Sin embargo, estos sistemas no están siempre disponibles para todos los productos, siendo particularmente difíciles de poner en práctica en el caso de productos importados de países donde no se exige la misma normativa. El fenómeno de la globalización de la industria y el mercado alimenticio ha supuesto la necesidad del establecimiento de controles adicionales.

2.2 Métodos experimentales para la identificación de especies en alimentos

Los sistemas actuales de identificación y detección de especies animales en productos para la alimentación se pueden agrupar en tres categorías atendiendo al tipo de molécula que analizan: los basados en el análisis de proteínas, los basados en la tecnología de DNA y otros sistemas que utilizan información independiente de DNA y proteína.

2.2.1 Sistemas basados en proteínas

Este tipo de métodos se basan en la detección de proteínas específicas de especie, o de patrones/perfiles proteicos específicos. Algunos de estos métodos se utilizan rutinariamente para la detección de especies en alimentos, sobre todo para las especies cárnicas (Hitchcock and Crimes, 1985; Skarpeid et al., 2001).

El uso de marcadores proteicos permitió obtener los primeros conocimientos de la estructura y heterogeneidad genética entre las diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. El diagnóstico de especies basado en identificación de proteínas se fundamenta en aspectos tales como las características físicas y químicas de la cadena de polipéptidos, el tamaño y la carga eléctrica total de la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional y la inmunoreactividad de epítomos específicos. Sin embargo, estas propiedades nativas pueden perderse o quedar modificadas drásticamente por condiciones térmicas o la adición de aditivos químicos que induzcan a la desnaturalización proteica o la proteólisis. Algunas técnicas proteicas adolecen de otras limitaciones, como el elevado coste y complejidad, que las hace inadecuadas para el análisis rutinario de muestras, la imposibilidad de detectar polimorfismos que no impliquen cambios en secuencia de aminoácidos, lo cual afecta sobre todo a la discriminación entre variedades o especies próximas; y lo más importante, no siempre se pueden aplicar puesto que la mayoría de las proteínas son termolábiles y se desnaturalizan durante el procesado de muchos alimentos, por lo que no son aplicables a productos sometidos a tratamientos térmicos intensivos (González et al., 2000).

A continuación se exponen brevemente las técnicas de identificación y cuantificación de especies basadas en proteínas o péptidos más utilizadas, junto con algunas propuestas experimentales.

2.2.1.1 Métodos inmunológicos

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Berger et al., 1988; Hofmann, 1997; Morales et al., 1994) o el inmunocromatográfico (Rao and Hsieh, 2007) se fundamentan en reacciones antígeno-anticuerpo y son, con diferencia, los métodos de identificación proteico de especies más utilizados y adecuados para aplicaciones de laboratorios de análisis y control de calidad. Estos métodos se basan en el uso de un anticuerpo preparado frente a una región antigénica característica de la especie lo que permite su detección mediante un anticuerpo secundario conjugado que permite la identificación visual o mediante técnicas analíticas convencionales como la espectrometría o fluorimetría. Los análisis se pueden utilizar como herramienta de detección y, en algunos casos, permiten también la cuantificación de proteína comparando con patrones con cantidades conocidas de la proteína diana. La inmunodetección ha encontrado aplicación sobre todo en la detección de especies de mamíferos y aves (Bovino, oveja/cabra, pollo), y en particular en la industria láctea. En la figura 1 se muestran los esquemas generales de detección mediante inmunoensayo en placa e inmunocromatografía en tiras.

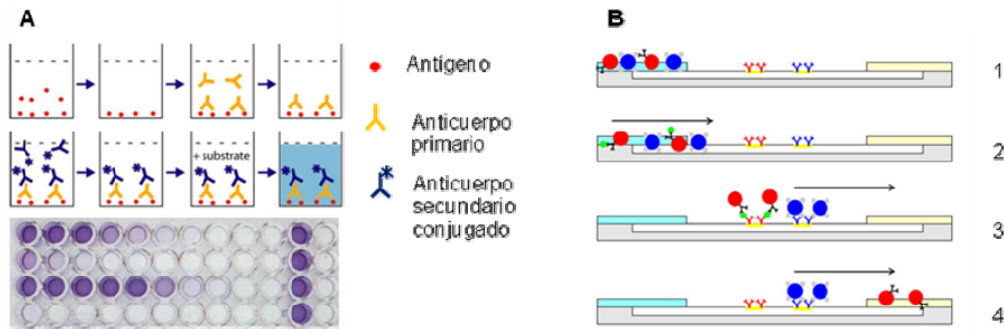


Figura 1. Inmunoensayos para detección de especies en alimentación. A: ejemplo de inmunoensayo ELISA: las proteínas procedentes de la muestra a analizar se depositan en pocillos a los que se añade el anticuerpo específico y, a continuación, el anticuerpo secundario que se une al primero. La adición de un sustrato que genera una señal detectable (cambio de color, emisión de luz o fluorescencia) permite identificar los pocillos en los que hay presencia del antígeno. B: ejemplo de inmunocromatografía en tiras con una zona reactiva con anticuerpos específicos y otra de control con anticuerpos anti-conjugado. Cuando la muestra contiene los antígenos, se puede observar el resultado positivo en dos puntos que aparecen en la banda, mientras que si el resultado es negativo tan sólo aparece un punto de control.

Otros métodos de inmunodetección, como la identificación al microscopio, permiten la detección llegando a conseguir una gran sensibilidad (límites de detección incluso por debajo de 0,1 ‰) (Michard and Ziebal, 1999). La inmunodifusión es un método simple muy adecuado para el desarrollo de kits comerciales, como es el caso de la determinación de leche de vaca en la leche de las oveja (Garcia et al., 1989). Por su sencillez y rapidez, el inmunoensayo es el método más utilizado para el análisis de especies proteicas en alimentos. Sin embargo adolece de algunas limitaciones importantes:

- La especificidad de los anticuerpos no siempre permite diferenciar entre especies muy próximas filogenéticamente. La especificidad de las regiones antigénicas es menor cuanto mayor sea el parentesco filogénico. Al obtener anticuerpos frente a una proteína que actúa como antígeno, esos anticuerpos reaccionarán positivamente al ponerse en contacto con esa proteína, pero también darán reacciones positivas al ponerlos en contacto con proteínas de otras especies filogenéticamente próximas. La intensidad aumentará cuanto mayor sea la semejanza entre las proteínas, y ésta cuanto mayor sea el parentesco entre las especies.
- La identificación depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos para esa especie. Especies no habituales, o alimentos en los que la variedad posible de especies es muy elevada, como ocurre con los alimentos derivados de la pesca, dificultan la elaboración de sistemas de identificación económicamente viables.
- Exigen una puesta a punto laboriosa ya que es necesario identificar epítomos específicos y generar nuevos anticuerpos para cada nueva especie a identificar.

• La detección depende de la conservación de la estructura del antígeno. Esta es una limitación importante puesto que en alimentos procesados, sometidos frecuentemente a etapas de esterilización por calor, las proteínas pueden perder la conformación requerida para la unión del anticuerpo. Por lo tanto, para que sea efectivo con productos cárnicos procesados, enlatados, etc., es necesaria la selección de péptidos resistentes a la desnaturalización por calor. En la actualidad existen varios kits comerciales que permiten la identificación inmunológica de las especies más comunes de la industria cárnica y láctea, con sistemas capaces de funcionar incluso con muestras calentadas a 100°C, pero no con muestras calentadas a temperaturas superiores (Kits IC y RC de Zeu-inmunotec (Zeu-inmunotec), ELISA-TEK de Elisa Technologies (Elisa Technologies) y otros).

2.2.1.2 Métodos electroforéticos

Los métodos electroforéticos están basados en la identificación de patrones de proteína específicos tras la separación por diferencias de movilidad de las proteínas bajo la acción de un campo eléctrico (García-Segura et al., 1996). La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) posee un gran poder de separación en función de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño.

Entre las técnicas electroforéticas se encuentra el método de isoelectroenfoque (IEF) en geles de poliacrilamida el cual logra separar las proteínas en un gradiente de pH en función de su punto isoeléctrico (Berrini et al., 2006; Mackie et al., 2000). El isoelectroenfoque se ha utilizado ampliamente en la identificación de numerosas especies animales en los alimentos (Skarpeid et al., 1998). Un ejemplo de IEF se encuentra representado en la Figura 2(A). En presencia de agentes desnaturalizantes, las proteínas pierden su estructura nativa. Aunque existen un gran número de estos agentes, fundamentalmente se usa urea y detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS). Son destacables los estudios que comparan el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) con el del isoelectroenfoque en presencia de urea (IEF-urea) para identificar 10 de las especies de peces más comunes tras su cocinado. Mediante la comparación de los resultados del análisis de 22 muestras de referencia, se ha propuesto la conveniencia de uno u otro método dependiendo de las especies analizadas (Etienne et al., 2000). Posteriormente se evaluaron ambos métodos comparando los resultados obtenidos para muestras de pescado fresco con filetes formados por procedimientos de alta presión. Cuando las proteínas no se han desnaturalizado, estos métodos no consiguen reproducir el perfil proteico de muestras frescas siendo el más adecuado para la distinción entre especies el IEF sin urea.

También se han aplicado métodos de electroforesis capilar basados en la determinación de los distintos tiempos de migración de las proteínas de cada especie a lo largo del capilar hasta el detector, lo que permite diferenciar los distintos perfiles proteicos entre especies (Vallejo-Córdoba and Cota-Rivas, 1998; Vallejo-Córdoba et al., 2010). Este método consigue una gran resolución pero resulta muy laborioso y es de difícil extrapolación a todas las especies de interés.

2.2.1.3 Inmunoelectroforesis

Es la combinación de una electroforesis en gel de agar o agarosa seguida de una inmunodifusión. En la primera se realiza la aplicación puntual de la muestra, lo que al final se traduce en que las distintas proteínas se encontrarán distribuidas a lo largo del gel según su migración. Acabada la electroforesis y sin efectuar la tinción, se practica en el gel un canal paralelo a la dirección de migración. En él se deposita un antisuero conteniendo los anticuerpos específicos frente a una o varias de las proteínas separadas en la electroforesis. Los anticuerpos y las proteínas difunden y producen complejos insolubles. Para que se produzcan los complejos se ha de dar una relación de equivalencia entre ambos componentes que es necesario determinar previamente ya que no son idénticas para todas las proteínas. La gran especificidad y sensibilidad de las reacciones de precipitación permite diferenciar sustancias con movilidades electroforéticas idénticas, además de detectar componentes que se encuentren en concentraciones a partir de microgramos (García-Segura et al., 1996). La inmunoelectroforesis es una técnica eminentemente cualitativa, que se desarrolla en condiciones nativas. Permite identificar sustancias en mezclas muy complejas pero requiere que tales sustancias sean inmunogénicas, y depende de los antisueros utilizados por lo que es difícil de estandarizar (Bjerrum, 1975).

2.2.1.4 Aplicación de la tecnología proteómica

Los nuevos métodos de análisis masivos de proteínas englobados bajo la denominación de análisis proteómico pueden ser utilizados igualmente en aplicaciones de identificación de especies en alimentos. En su forma más básica, este análisis puede limitarse a la comparación de patrones de migración de proteínas tras electroforesis bidimensional. La separación de proteínas se realiza en función de su carga eléctrica, su tamaño y su masa molecular. Esto se debe a que, en primer lugar, se lleva a cabo un IEF en el que la separación se produce debido a los distintos puntos isoeléctricos de las proteínas en un gradiente de pH y posteriormente la separación se realiza por las diferencias entre las masas moleculares de las proteínas mediante la aplicación de PAGE-SDS (Jemmi and Schlosser, 1991, 1993; Wintero et al., 1990). La técnica es laboriosa en comparación con otras disponibles, sin embargo se ha utilizado preferentemente cuando la identificación puede ser problemática debido a la proximidad entre especies o al tipo de material a analizar. Para estos casos la técnica es de gran utilidad y se considera como un criterio de pureza positivo por su gran poder de resolución. Es el caso de identificación a través de metodologías proteómicas de especies de peces procedentes de pesca extractiva (Carrera et al., 2006; Martinez and Friis, 2004; Pineiro et al., 2003; Pineiro et al., 2001), la clasificación diferencial de diez especies comerciales estrechamente relacionadas de la familia *Merlucciidae* (Carrera et al., 2006), o el análisis de los péptidos y las proteínas constituyentes del extracto soluble de quesos preparados con leche de vaca, oveja o cabra, en el que se demuestra como mediante la electroforesis en gel no pueden resolverse de forma inequívoca las diferencias entre las proteínas de suero de leche y péptidos de

caseína propias de cada especie y, sin embargo, se puede determinar de qué especie es la leche a través de la proteómica mediante el perfil de péptidos (Pappa et al., 2008). Estos métodos pueden ser particularmente útiles en la determinación de subpoblaciones en especies que están sometidas a sobrexplotación, como se ha demostrado recientemente para el caso de la merluza en el atlántico (González et al.). En otros ensayos ha sido posible detectar especies cárnicas, con límites de detección próximos al 1%, mediante la detección de péptidos específicos, tras digestión de miosina con tripsina, por espectrometría de masas MALDI-TOF (de sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight, figura 2 (B)).

La *Regulatory Fish Encyclopedia* de la US Food and Drug Administration se creó para ayudar a los reguladores a identificar la sustitución de especies que podrían dar lugar a posibles consecuencias adversas o ser una fuente de fraude económico. Para esto, recogen fotografías de alta resolución del pescado entero y sus formas de producto comercializado así como patrones bioquímicos específicos para esas especies de peces. Actualmente, estos patrones incluyen datos de estudios de enfoque isoelectrico logrando la identificación y cuantificación de las especies descritas mediante un sistema de comparación de los perfiles obtenidos por IEF de las muestras con los patrones de los marcadores proteicos, también utilizados para normalizar la posición de migración (U.S. Food and Drug Administration, 2010).

En definitiva, son métodos de desarrollo incipiente que pueden derivar a aplicaciones identificativas una vez que los costes y complejidad actual se vean reducidos.

2.2.2 Sistemas basados en el análisis de ácidos nucleicos

Las técnicas genéticas de identificación están basadas en la detección de secuencias de DNA únicas para cada especie. La molécula de DNA ofrece una serie de ventajas cuando se compara con los marcadores proteicos. En primer lugar, la información genética que contienen los tipos celulares de un individuo es idéntica y por tanto la identificación es independiente del tejido. En cambio, las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta según el tejido, la etapa del desarrollo, el ambiente e incluso de la época del año. Otra ventaja deriva de la degeneración del código genético, por la existencia de más codones que aminoácidos. El que un determinado aminoácido pueda estar codificado por más de un triplete, otorga al DNA un carácter más informativo debido a su mayor variabilidad (Lockley and Bardsley, 2000a). En la identificación molecular de especies es importante tener en cuenta que las regiones de DNA seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad suficiente como para que especies estrechamente relacionadas presenten secuencias de nucleótidos diferentes, permitiendo su diferenciación, pero a su vez, que esta velocidad sea lo suficientemente lenta como para que tales diferencias no aparezcan dentro de la misma especie. Otra de las características del DNA es su estabilidad

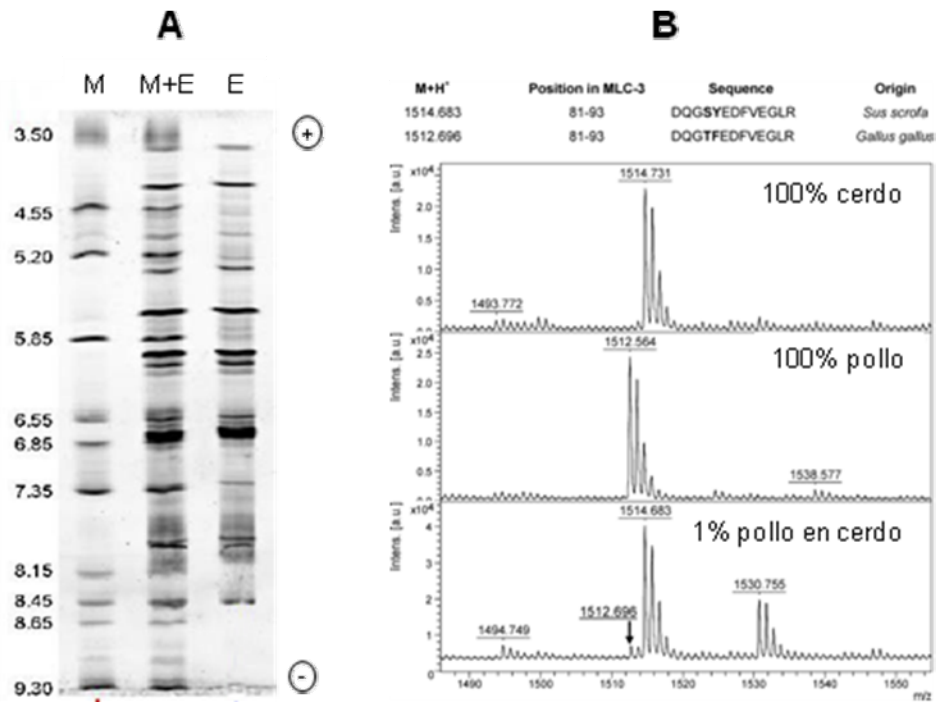


Figura 2. Ejemplos de resultados obtenidos con técnicas de Isoelectroenfoque (IEF) y espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación de especies. A: Perfiles de las muestras M y E por separado que permiten la determinación de la muestra central con mezcla de ambos perfiles por IEF (U.S. Food and Drug Administration, 2010); B: Resultados de detección y cuantificación de carne de pollo y de cerdo en mezclas de carne, utilizando la tecnología MALDI-TOF MS (Sentandreu et al., 2010). El péptido marcador para pollo, indicado con una flecha, se localiza en m/z 1512.69.

a altas temperaturas. En los procesos de elaboración de conservas en los que se alcanzan elevadas presiones y temperaturas, las proteínas se desnaturalizan y se degradan mientras que el DNA sufre fragmentación, reduciéndose hasta un tamaño medio de 100-200 pb. Aunque la molécula de DNA se fragmenta debido a estos procesos, la información de la secuencia de los fragmentos sigue siendo útil para la identificación siempre que éstos tengan la longitud suficiente para ser analizados (Mackie et al., 1999). La práctica totalidad de los sistemas de identificación de especies en alimentos basados en DNA utilizan la amplificación mediante PCR, ya que permite detectar cantidades muy pequeñas de DNA a partir de los materiales más diversos. En general se considera que, en una misma muestra procesada, las proteínas pierden antes su capacidad de identificación por métodos inmunológicos que el DNA su viabilidad para ser amplificado por PCR. Otra de las ventajas importantes del uso de DNA, es que los datos de secuencia pueden analizarse atendiendo a distintos niveles de especificidad desde grupos o especies hasta incluso variantes o modificaciones genéticas de individuo (Lockley and Bardsley, 2000a).

Actualmente, debido al mayor conocimiento del genoma de muchos organismos y la a disponibilidad de mejoras en los métodos de amplificación, los sistemas de detección e identificación basados en DNA han tenido un desarrollo importante, complementado o

sustituyendo en algunos casos las técnicas basadas en proteína. Todas las técnicas basadas en DNA tienen ventajas e inconvenientes particulares dependiendo de las características del análisis. Entre las cualidades de estos sistemas, se ha demostrado que los métodos basados en DNA consiguen la detección con gran precisión y poder de resolución, se logra con facilidad la adaptación de los test a aplicaciones para otras especies y permite la incorporación de nuevas tecnologías surgidas de la investigación genómica. Entre las desventajas se encuentra su coste económico, aunque cada vez van siendo más accesibles, y la relativa facilidad de contaminación de las muestras, de forma que DNA contaminante puede ser amplificado fácilmente dando lugar a falsos positivos. Igualmente, posibles contaminaciones con DNAsas pueden afectar a los resultados. Otras posibles desventajas pueden proceder de la necesidad de cualificación del personal en las técnicas, tanto para su ejecución como para la interpretación de resultados. La selección de la herramienta molecular dependerá por lo tanto del tipo de problema por resolver, del coste de la técnica, del número de muestras a analizar y de la disponibilidad de medios materiales y humanos.

Entre los métodos de identificación de especies por análisis genético se destacan a continuación los más extendidos.

2.2.2.1 PCR-Secuenciación

Los métodos basados en amplificación mediante PCR y secuenciación de regiones variables constituyen la forma más directa y precisa (dependiendo del tamaño y el número de genes marcadores analizados) de obtener información de los productos de PCR ya que se obtiene la secuencia completa de la región amplificada (Bartlett and Davidson, 1992; Matsunaga et al., 1999). A pesar de inconvenientes, como la necesidad de disponer del equipo de secuenciación, la información pormenorizada que arroja la secuenciación puede aprovecharse posteriormente para el desarrollo de otros métodos basados en PCR como la identificación mediante fragmentos de restricción (Kim et al., 2010; Ram et al., 1996). En muchos casos, una vez obtenida la secuencia a partir de la muestra analizada, se procede a realizar un análisis filogenético mediante comparación con secuencias pertenecientes a otras especies. De este modo, se identifica la especie de la que procede la muestra de alimento analizada, permitiendo la adscripción de la secuencia a una especie o género determinado de forma estandarizada. Esta metodología se ha denominado FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing) (Bartlett and Davidson, 1992). El inconveniente fundamental de este método es su coste. No obstante, dado su potencial para la investigación biológica y biomédica, se han desarrollado en los últimos años plataformas especializadas en secuenciación de DNA, logrando reducir el costo de DNA secuenciado hasta en dos órdenes de magnitud así como el tiempo de análisis (Shendure and Ji, 2008)

Muchos estudios de identificación de especies mediante análisis de secuencia se han basado en la búsqueda de regiones variables en DNA mitocondrial, sobre todo en regiones codificantes como los genes citocromo b o citocromo oxidasa I (Jerome et al., 2003). Sin embargo, también se ha aplicado esta técnica usando fragmentos procedentes de genes nucleares como los de la α -actina, el DNA-ribosomal-5S y la rodopsina, entre otros utilizados para la discriminación entre especies de peces (Fishbol; Fishtrace). Las iniciativas del *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), promovida por la Smithsonian Institution (Barcode of Life), pretenden elaborar catálogos genéticos validados de un número extenso de especies animales que permitan su identificación genética por cualquier método basado en el análisis de secuencias. Dentro del consorcio se desarrollan un gran número de proyectos enfocados a grupos concretos de especies (hongos, lepidópteros, peces, etc.). El proyecto Fishtrace (Fishtrace) ha creado por su parte una colección de referencia de muestras de especies pesqueras de interés en Europa, generando al mismo tiempo una base de datos genética validada que facilita el diseño de métodos de análisis para la identificación de estas especies. Aunque no directamente relacionado con el uso de PCR-secuenciación, el reciente proyecto Fishpoptrace (Fishpoptrace), se ha centrado en la identificación de polimorfismos en las especies pesqueras más importantes que permitan realizar identificar muestras dentro de las distintas poblaciones de la misma especie, lo que permitiría trazar la procedencia de lotes de pescado y realizar un control más preciso de la explotación de las poblaciones.

2.2.2.2 Digestión con enzimas de restricción: PCR-RFLP

En este método, el DNA obtenido de las muestras a analizar se amplifica con cebadores adecuados a la especie o grupo filogenético y los productos de amplificación se digieren con enzimas de restricción, que cortan el DNA de doble cadena mediante el reconocimiento de una secuencia específica. Posteriormente se procede a la separación de los fragmentos de acuerdo con su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La presencia o ausencia de bandas de tamaño preciso permite asignar el DNA de la muestra a una especie determinada. Es uno de los métodos más extendidos, sobre todo por su utilización sobre genes mitocondriales conservados, aunque recientemente hay descritos sistemas que utilizan DNA nuclear para la discriminación de un número elevado de especies de vertebrados (Kim et al., 2010). La principal limitación de los métodos basados en polimorfismos de restricción es la dificultad para encontrar sitios de reconocimiento adecuados para enzimas de restricción que permitan obtener patrones diferenciables dentro de los geles de agarosa (Meyer et al., 1995; Wolf et al., 1999). Por otra parte, es uno de los métodos menos adecuados cuando se analizan mezclas de especies, ya que el patrón de bandas puede llegar a ser confuso por la presencia de varios patrones de restricción superpuestos en la misma reacción. Recientemente se han propuesto mejoras metodológicas que permiten una mayor

resolución de sistemas RFLP, utilizando cebadores marcados con fluorescencia y el uso de electroforesis capilar (Wang et al., 2010).

2.2.2.3 Polimorfismos de conformación de cadena simple: PCR-SSCP

El proceso PCR-SSCP consiste en la desnaturalización de los productos de PCR en cadena simple de DNA, seguido de la renaturalización favoreciendo los apareamientos intercatenarios, para finalmente separar los productos en un gel de poliacrilamida. Cada hebra de DNA de los amplicones adoptan una conformación dada, dependiente de la secuencia nucleotídica, que afecta su migración en el gel. Este método basado en las diferencias en la movilidad electroforética ha demostrado la utilidad de la existencia de diferentes formas de disposición de los fragmentos de DNA como método para identificar la presencia de especies de origen animal potencialmente presentes en piensos animales y, en algunos casos, permite la identificación de DNA de diferentes especies animales en una mezcla (Huby-Chilton et al., 2010). Igualmente, un método basado en el análisis de heterodúplex para la detección de mandarina y naranja fue patentado en 1998 (Knight, 1998). Este método no parece sin embargo haber sido posteriormente aplicado, probablemente por la dificultad para ser estandarizado y la dificultad técnica que entraña.

2.2.2.4 PCR en chips: arrays y microarrays de DNA

La tecnología de array de DNA, en su vertiente de identificación de polimorfismos (Guo et al., 1994), se ha intentado transferir tanto a la identificación de especies animales como a la detección de material procedente de organismos modificados genéticamente. Mediante la hibridación de productos de amplificación por PCR, obtenidos a partir de la muestra problema, con un número elevado de sondas oligonucleotídicas inmovilizadas sobre un soporte sólido, los microarrays de DNA permiten la detección simultánea de muchos marcadores genéticos. El patrón de hibridación que se obtiene revela la presencia de una secuencia concreta, permitiendo detectar incluso SNPs. Por su capacidad, este tipo de tecnología es más adecuada para la discriminación de especies en los casos en los que la variabilidad es muy elevada, como es el caso de las especies procedentes de pesca extractiva. Se han descrito DNA microarrays de oligonucleótidos para la identificación de 11 a 50 especies de peces (Kochzius et al., 2008). Hasta el momento, la aplicación que ha encontrado un mayor desarrollo es la realizada por asociación entre Affimetrix y Biomerieux, que llegó a comercializar en 2005 un microarray de DNA útil para la identificación de 33 especies "Food Expert ID", incluyendo mamíferos, aves y peces de importancia comercial. El sistema utilizaba una estación automatizada para el procesamiento de las placas de array, lo que permitía realizar la hibridación y escaneo de la matriz en 1 hora (BioMérieux). El sistema, sin embargo, no se encuentra actualmente disponible, debido probablemente a que su alto coste lo hacía inasequible para los laboratorios de control de calidad y seguridad alimentaria.

La estricta regulación europea que aplica a los productos derivados de organismos modificados genéticamente ha permitido el desarrollo de tecnología de arrays de DNA para la identificación de transgénicos autorizados y no autorizados. El sistema, desarrollado por Eppendorff, DualChip[®] GMO Kit, permite la identificación de 30 elementos transgénicos junto a los correspondientes controles para distintas especies vegetales utilizando cebadores biotinilados y un detector colorimétrico (Eppendorf Array Technologies).

Debido a su coste elevado y al hecho de ser relativamente laborioso frente a otras metodologías, los arrays de DNA, al menos en su configuración actual, no parecen una alternativa viable para su uso como método general de identificación de especies en la industria alimentaria.

2.2.2.5 Otros métodos genéticos: repeticiones en tándem, AFLP y RAPD.

En este epígrafe se agrupan técnicas que, si bien se utilizan preferentemente para detectar polimorfismos entre especies o subpoblaciones, se pueden usar en algunos casos para la detección de especies o, más frecuentemente, subespecies y razas de interés en la industria alimentaria. En otras ocasiones, se han utilizado para identificar secuencias polimórficas que permitan diferenciar especies mediante otros métodos, como amplificación con cebadores específicos.

- DNA satélite: los microsátélites de DNA, también denominados *short tandem repeats* (STR), son secuencias de 1 a 6 bases repetidas en tandem que varían en longitud entre distintas especies o entre diferentes poblaciones dentro de una misma especie y se utilizan de forma habitual en estudios filogenéticos y aplicaciones forenses, ya que permiten llegar a establecer diferencias entre individuos. En el caso de la industria agroalimentaria, analizando la longitud de un número determinado de STRs (normalmente entre 10 y 40), es posible adscribir la pertenencia de un individuo a un grupo o población dado, lo que permite incluso trazar el origen geográfico del producto (Dalvit et al., 2007; Ganopoulos et al., 2011). Por sus características, estos métodos son especialmente útiles para la identificación del origen geográfico de especies de pescado y vegetales (Melchiade et al., 2007). En otros casos, se ha utilizado DNA satélite centromérico para identificar especies en híbridos, ya que, al detectar polimorfismos en DNA nuclear, identifica tanto las secuencias paternas como las maternas (Verkaar et al., 2002; Zhang et al., 1999).

- Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo inglés AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*): Estos métodos se basan en las repeticiones de nucleótidos en tándem específicas de especie en zonas de microsátélites de DNA. La técnica se desarrolla en tres pasos: *i.* digestión con enzimas de restricción y ligación a adaptadores específicos, *ii.* amplificación selectiva con cebadores que hibridan con la secuencia generada por la unión de los adaptadores a los sitios de restricción y *iii.* electroforesis de los fragmentos

amplificados. El método permite la co-amplificación de un gran número de fragmentos de restricción (generalmente entre 50-100) y su análisis en geles de poliacrilamida simultáneamente. Debido al gran polimorfismo que presentan se posibilita, tras PCR, la diferenciación mediante electroforesis incluso entre poblaciones, individuos y progenies (Vos et al., 1995). Aunque se han desarrollado técnicas basadas en AFLP para diferenciar especies, sobre todo en peces y vegetales (Campos et al., 2005; Congiu et al., 2002; Zhang et al., 2007b), esta técnica no sería fácilmente trasladable al desarrollo de test-kits ni al diagnóstico comercial en múltiples especies ya que resulta difícil encontrar cebadores comunes para varias especies y la adscripción inequívoca suele requerir más recursos experimentales (Janssen et al., 1998).

- DNA polimórfico amplificado al azar, conocido por las siglas RAPD (del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*): Las técnicas basadas en amplificaciones aleatorias de DNA polimórfico se basan en el uso de un juego de cebadores cortos de secuencia arbitraria. Esto permite amplificar distintos fragmentos de un genoma en la misma reacción, que genera un patrón característico de la especie. Estos patrones son además útiles para establecer relaciones filogenéticas entre especies. Entre las ventajas principales de los RAPDs se puede mencionar que, al utilizar secuencias arbitrarias no se requiere identificar previamente las secuencias diana, pudiéndose aplicar sobre genomas anónimos; la posibilidad de aplicarse en muestras con escasa cantidad de DNA y su bajo coste económico (Hadrys et al., 1992). Sin embargo, requieren que el DNA se encuentre en buenas condiciones y comprobar que la cantidad del DNA molde es la adecuada para trabajar con ciertas garantías. Si existiese fragmentación excesiva la amplificación no se realizaría en fragmentos con la misma longitud por lo que los patrones de polimorfismos serían variables y la repetitividad entre experimentos con mismo DNA molde y cebador no serían posible. Por esto, su adaptación a test de rutina resulta difícil por las dificultades que supone el análisis de muestras de alimentos procesados (Cushwa and Medrano, 1996). A pesar de estas dificultades, se han propuesto métodos de identificación basados en RAPDS para varias especies animales y vegetales (Asensio et al., 2002; Bektas and Belduz, 2007; Hadrys et al., 1992; Liu et al., 2006), entre las cuales también se han descrito métodos para identificación de especies cárnicas (Cushwa and Medrano, 1996; Saez et al., 2004) y una patente para la identificación de una variedad de naranja en zumos (Lindsey and Twell, 1994). Al igual que en el caso de la patente para identificación de cítricos mediante PCR-SSCP mencionado anteriormente, esta propuesta no parece haber tenido continuidad práctica por los mismos motivos de dificultad técnica inherente al método.

2.2.2.6 Amplificación específica de fragmentos de PCR.

La amplificación específica de fragmentos de PCR se basa en la identificación de secuencias polimórficas sobre las que se diseñan cebadores y/o sondas que

permitan la identificación de la secuencia mediante un sencillo ensayo de amplificación por PCR. Este tipo de aproximación es más simple y económica que los otros métodos descritos de detección genética, y sólo está limitada por el propio diseño experimental, en el que la especificidad y sensibilidad dependen directamente de la disponibilidad de secuencias adecuadas que permitan la discriminación de la especie objetivo de las especies filogenéticamente próximas. Este es el tipo de metodología aplicado en los trabajos que componen esta tesis, y sus características se analizan en detalle en el apartado 2.3.

2.2.3 Otros métodos

Además de las técnicas basadas en proteínas y en DNA también se han desarrollado otras tecnologías como:

- Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS): con la que se ha logrado la detección de tejido nervioso del sistema central desarrollando esta técnica para esfingolípidos específicos de especie (Niederer and Bollhalder, 2001).
- Microscopía: por la que se pueden identificar estructuras características de determinados tejidos sin usar anticuerpos (Cammarato et al.).
- Análisis de la proporción de isótopos estables mediante espectrofotometría de masas: esta técnica se ha utilizado para determinar la procedencia de alimentos animales y vegetales debido a que la proporción del isótopo Nitrógeno ^{15}N en muestras que han sido alimentadas con proteínas animales será mayor que si lo han sido con proteínas vegetales. La proporción $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ resulta más elevada en carnívoros que en omnívoros y estos la tienen mayor a su vez que los herbívoros. Se ha propuesto el análisis de relación de isótopos estables como un método para estudiar la alimentación recibida y la autenticación de origen geográfico ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) en carne de cordero y vaca (Piasentier et al., 2003; Schmidt et al., 2005). El contenido total en ^{15}N también puede usarse para autenticar alimentos vegetales orgánicos pudiendo diferenciar entre los cultivados en suelos tratados con fertilizantes, en los que se encuentra menor cantidad del isótopo, de los vegetales que han crecido en suelos no tratados. Así mismo, la determinación de ^{15}N se ha propuesto como un indicador de manejo de la fertilización cítricos, ya que puede diferenciar si se han aplicado fertilizantes orgánicos, incluso de diferentes orígenes. La principal desventaja de esta técnica es la imposibilidad de analizar plantas fijadoras de nitrógeno (leguminosas) (Rapisarda et al.).
- Cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de gases (GC o HPLC) para la detección de los perfiles químicos: La detección de las grasas vegetales que se agregan a las mantequillas de cacao del chocolate forma parte de los métodos actuales para la autenticación de manteca de cacao. Los perfiles de triglicéridos específicos obtenidos por GC de alta resolución permiten la detección de las grasas

vegetales añadidas a mantequillas de cacao, así como la cuantificación de ésta adición a partir de un nivel de 5% - 10% según el tipo de grasa añadida. Este sistema requiere que las modificaciones en patrones de triglicéridos sean lo suficientemente significativas para distinguir distintas variedades o alteraciones en la composición de los ingredientes de los alimentos, y será útil en función de cual sea el valor permitido por ley (Simoneau et al., 1999). La comparación de los resultados de cuantificación de los triglicéridos añadidos a mantequillas de cacao con GC y HPLC consigue resultados y precisiones de magnitud comparable, por lo que cualquiera de estos métodos se puede aplicar para evaluar la pureza de la manteca de cacao. El método de GC capilar tiene algunas ventajas como un menor tiempo de ejecución y un consumo de productos químicos insignificante (Buchgraber et al., 2000).

- Espectroscopía infrarroja cercana (NIR): detecta variaciones estructurales significativas causadas por la incorporación a la especie de un DNA exógeno. Sin embargo no permite detectar pequeños cambios en el DNA o en una proteína. Se utiliza en la industria de semillas por ser una técnica no destructiva que permite el análisis de humedad, proteína, grasa, fibra y almidón (Hacisalihoglu et al., 2009). También ha sido utilizada para distinguir los alimentos transgénicos (Alishahi et al., 2010) y la detección y cuantificación del fósforo inorgánico de la soja, ya que indica el contenido de ácido fítico o inositol, un componente de importancia ambiental y nutricional (Delwiche et al., 2006). Igualmente se ha estudiado para diversas aplicaciones relacionadas adulteraciones por sustitución de especies en los alimentos, como por ejemplo en la industria de marisco. Es la forma más común de fraude ya que tras el procesado de los mariscos, varían las propiedades morfológicas de las especies de mariscos, impidiendo a los consumidores distinguir un tipo de organismo de otro. Mediante NIR y espectroscopia en la zona visible, se encontraron adulteraciones del 10% en carne de cangrejo *Callinectes sapidus* con *Portunus pelagicus* (Gayo and Hale, 2007). Como ventajas destacan su rapidez ya que consigue los análisis en tan sólo un minuto, que no es destructivo al no requerir preparación previa de la muestra y que resulta un método de bajo coste en relación con métodos como PCR y ELISA. La principal desventaja es que no permite la identificación de compuestos y que necesita una calibración previa para cada tipo de análisis (Alishahi et al., 2010).

- SNIF-NMR[®] (Site-specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance): es la técnica que utiliza la resonancia magnética nuclear produciendo patrones atómicos distintos para cada sustancia, permitiendo analizar biomoléculas con gran precisión a nivel atómico. La compañía Eurofins Scientific ha desarrollado esta técnica, patentada como SNIF-NMR[®], logrando la identificación de un producto, conocer el método de producción del mismo y, en algunos casos, el origen geográfico, mediante la comparación de patrones atómicos en la base de datos. Este

método ha sido utilizado para el análisis fraudes en la producción de vinos, piensos, aromatizantes, productos químicos, cosméticos y farmacéuticos (Eurofins Scientific).

2.3 Diseño de métodos de identificación de especies mediante amplificación específica de DNA

Los métodos de identificación de especies basados en cebadores específicos de especie se han desarrollado gracias al incremento de la información genómica en las bases de datos, cada vez disponible para más especies, que posibilitan la búsqueda de polimorfismos susceptibles de usarse para el diseño de cebadores específicos de especie. Bajo condiciones adecuadas, estos cebadores producen amplificación sólo si en la muestra se encuentra presente el DNA de la especie para la que han sido diseñados. Los análisis mediante PCR con cebadores específicos de especie son relativamente rápidos, pero suelen requerir otros procedimientos posteriores, como secuenciar el producto amplificado o digerir con nucleasas de restricción.

Mediante la combinación en la misma reacción de cebadores específicos combinados con un homólogo común para varias especies, es posible comprobar la presencia de varias especies simultáneamente. Este cebador no selectivo ha de diseñarse en una zona de la secuencia que sea común para las especies a analizar y debe contar con una ubicación estratégica para lograr la discriminación de los productos generados por la presencia de distintas especies en función del tamaño de los mismos (Lockley and Bardsley, 2000a). Así, se han descrito diferentes sistemas mediante reacciones multiplex para la detección de especies usadas en alimentación (Lockley and Bardsley, 2000b; Matsunaga et al., 1999; Meyer et al., 1994).

El PCR se basa en la amplificación *in vitro* del DNA que permite la obtención de microgramos de DNA a partir de cada molécula inicial (Saiki et al., 1988). Cualquier segmento de DNA o de RNA puede ser amplificado siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes con las que puedan hibridar los oligonucleótidos complementarios que actúan como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde. Una pequeña disminución en la eficacia de cada ciclo puede reducir enormemente la producción final. Así, si disminuye la eficiencia un 5% en cada ciclo, tras 25 ciclos se conseguiría sólo la mitad del producto esperado. Por esto, es conveniente optimizar las concentraciones individuales de cada componente de la reacción y los parámetros de temperatura y tiempo. No todos los componentes tienen la misma importancia, siendo los más críticos la concentración del ión magnesio, el diseño y selección de los cebadores, la optimización de temperaturas, tiempos y la propia muestra (Ling et al., 1991).

Los resultados de PCR son muy sensibles a las condiciones de amplificación por lo que deben ser cuidadosamente controladas para lograr repetitividad y evitar posibles variaciones entre laboratorios o experimentos así como falsos negativos y

falsos positivos (Edwards and Gibbs, 1994). Entre los muchos factores que pueden influir en el resultado final del PCR, son destacables el diseño apropiado de los cebadores, la calidad y concentración del DNA, la presencia de inhibidores o de contaminación, la concentración de magnesio, el tipo y la cantidad de DNA polimerasa y el programa de amplificación. Para controlar los resultados de la reacción se deben llevar a cabo en las mismas condiciones que las muestras a analizar los siguientes controles (Kocher and Wilson, 1991):

- Control negativo: una reacción con todos los reactivos excepto el DNA molde para comprobar la ausencia de DNA contaminante en todos los reactivos. La contaminación puede deberse a una molécula de DNA remanente de un proceso previo, a un cruce contaminante con otra muestra, a un operador, o incluso a microorganismos presentes en el ambiente.
- Control de extracción: PCR realizado con muestra procedente de una extracción realizada en paralelo con agua destilada para comprobar la ausencia de DNA en las soluciones de extracción o detectar DNA contaminante.
- Control positivo: es una reacción realizada con DNA molde conocido, para comprobar el correcto funcionamiento de las soluciones de extracción y detectar DNA transportado entre muestras.
- Control interno positivo: es una reacción en la que, además de la muestra de DNA a analizar, se añade DNA control que amplifique con los cebadores. Este control es útil para determinar si la muestra de DNA contiene inhibidores de la PCR, y se suele utilizar cuando es crítico evitar la aparición de falsos negativos.

En la práctica, la reacción PCR es compleja, pues la concentración de los cebadores y de los nucleótidos libres disminuye en cada ciclo, mientras que va aumentando la cantidad de producto. La competencia de unión entre los cebadores complementarios y los productos hace que el sistema llegue eventualmente a un límite en el que la cantidad de producto no se incrementa, por lo que el número óptimo de ciclos depende de la concentración inicial de DNA una vez que la reacción se ha optimizado (Innis et al., 1999).

Otra limitación de esta técnica viene dada por los errores que comete el enzima Taq polimerasa. Las sustituciones de bases ocurren aproximadamente 1.1×10^{-4} / pb y los cambios de estructura y mutaciones en una cada 2.4×10^{-5} / pb. Esto es debido probablemente a la ausencia de actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ en la enzima purificada. Un error en 1.1×10^{-4} / pb parece insignificante, sin embargo, tras 30 ciclos de amplificación da un error cada 300 pb de producto. Estos errores serían observables si la amplificación se realiza a partir de una única molécula de DNA, no obstante, si la reacción de PCR se realiza a partir de cientos de moléculas de DNA

estos errores son únicamente el 0.3% de los productos y no son observables (Tindall and Kunkel, 1988).

2.3.1 Diseño de cebadores y sondas

La región del DNA a amplificar debe estar limitada por oligonucleótidos definidos que hibridan con la molécula diana. Esto significa que la secuencia de DNA debe ser ya conocida, o al menos predecible con un 90% de certeza en las regiones donde el cebador hibrida (Lockley and Bardsley, 2000a). El grado de variación genética a lo largo del genoma de una especie no es constante, por lo que su identificación molecular debe dirigirse a áreas del genoma que sean suficientemente significativas para diferenciarlas de otras especies cercanas.

Los genes mitocondriales son idóneos para la identificación de especies debido a que la tasa de mutación del DNA mitocondrial de los animales es superior a la del DNA nuclear (Brown et al., 1979). Esto lo hace más útil para analizar diferencias de los individuos dentro de las especies y de especies estrechamente o moderadamente relacionadas. La ventaja radica en que presentan suficiente grado de homología para diseñar cebadores comunes para varias especies, y posiciones variables intercaladas que pueden utilizarse para el diseño de sondas específicas. La menor tasa mutacional que presentan los genes estructurales nucleares no impide que su análisis permita definir eficientemente cebadores útiles para distinguir entre especies (Carrera et al., 2000). De hecho, el uso de genes nucleares como marcadores complementarios de los genes mitocondriales permite diseñar sistemas de cebadores y sondas comunes para un mayor número de especies y aumentar tanto la versatilidad como la seguridad de los diagnósticos. Sin embargo, el hecho de que la proporción de DNA mitocondrial es mayor (aproximadamente 1000 X copias de DNA nuclear) en las muestras a analizar, ha favorecido hasta ahora el uso de DNA mitocondrial en sistemas de identificación de especies (Teletchea et al., 2005). Una alternativa al DNA mitocondrial es el uso de regiones de DNA nuclear que contienen secuencias repetidas, generalmente procedentes de retrotransposones, SINES y LINES (*short y long interspersed nuclear elements*), los cuales se encuentran en grandes cantidades en el DNA nuclear de eucariotas y conjugan un elevado número de copias. Estas características los hacen útiles para detectar pequeñas cantidades de DNA por PCR, y debido a su localización nuclear, se evita la variabilidad asociada al número de mitocondrias por célula dependiente de tejido. Algunos sistemas de identificación de especies se han basado en estas secuencias (Mendoza-Romero et al., 2004; Tajima, 2002; Walker et al., 2003).

Los genes mitocondriales *cytB* y la COXI son los más utilizados para estudios de filogenia ya que disponen de regiones conservadas, sobre las que se pueden diseñar cebadores “universales” que pueden usarse para la amplificación de un amplio número de especies, y regiones variables, lo que permite la identificación a nivel de especie por secuencia, y el diseño de cebadores para la amplificación específica de especies (Kocher et al., 1989). Sin embargo, en el caso de la identificación de variedades, orígenes geográficos o de

individuos, resultan más apropiados por su mayor variabilidad la región de control *D-loop* del DNA mitocondrial (Gongora et al., 2004), o secuencias de DNA nuclear tales como microsatélites (Cunningham and Meghen, 2001; Nielsen et al., 2001) o polimorfismos en genes asociados a alguna característica diferenciadora de la variedad o raza (Maudet and Taberlet, 2002). También ha sido utilizado en varias ocasiones la combinación tRNA_{Glu} y *cytB* del genoma mitocondrial como marcador diferencial de vertebrados mediante RFLP (Kingcombe et al., 2001).

En cuanto al diseño de los cebadores para lograr la especificidad de especie, se ha demostrado que el extremo 3' del cebador es crítico para la amplificación. En condiciones adecuadas de reacción, un desapareamiento del nucleótido situado en ese extremo inhibe la amplificación. El uso de cebadores específicos basados en cambios de base en el extremo 3' han sido descritas para la discriminación de especies filogenéticas muy próximas (Kwok et al., 1990; Lockley and Bardsley, 2002). Los desapareamientos en la región interna del cebador afectan a su especificidad dependiendo de su carácter y posición relativa. Cuantitativamente, se ha encontrado que las hibridaciones con cambios en los nucleótidos Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G) tales como A-A, G-A, A-G, C-C, producen una disminución de la amplificación mucho más acusada que si se trata de otros cambios como A-C, C-A, T-G, G-T (Stadhouders et al.). Los cebadores con T, C o G en el extremo 3', son más específicos que los que contienen el nucleótido A ya que estos últimos logran la amplificación independientemente de los nucleótidos del DNA diana. En el caso de que la especificidad se base en el penúltimo nucleótido, la eficiencia de amplificación se reduce, especialmente si se trata del nucleótido A (Ayyadevara et al., 2000). Por otra parte, un desapareamiento en la zona central del cebador tiene un efecto mucho más drástico en la temperatura de anillamiento que los desapareamientos en las zonas laterales (Hall et al., 2001; Rennie et al., 2008).

2.3.2 Factores de la reacción de polimerasa en cadena a considerar en las aplicaciones de identificación de especies

2.3.2.1 Extracción de DNA: material de origen, método de extracción, cantidad requerida y calidad

En general, para la reacción de PCR no es necesario disponer gran cantidad ni calidad de DNA, pudiendo este encontrarse tanto en estado mono como bicatenario. En alimentos es importante conocer el origen de las muestras, así como los posibles procesos a los que han sido sometidas. Los tratamientos térmicos pueden producir precipitación de proteínas que se arrastran durante el proceso de purificación e inhiben finalmente la PCR. Una fragmentación excesiva de DNA producida por calor puede igualmente afectar la amplificación al producirse fragmentos de menor tamaño que el amplicón. En el caso de muestras envasadas sometidas a tratamiento térmico, como atún en lata, o en muestras procedentes de carnes procesadas, no se ha logrado la amplificación de fragmentos mayores de 200 pb (Frezza et al., 2003; Prado et al., 2004; Quinteiro et al., 1998). Por otra

parte, una ligera fragmentación del DNA sería incluso deseable, ya que se facilitaría la desnaturalización de la muestra y se permitiría un mejor acceso a la misma por parte, tanto del cebador, como de la polimerasa.

La cantidad de DNA utilizada por reacción es muy variada, desde microgramos a cantidades tan pequeñas como el DNA extraído de una sola célula (Zhang et al., 1992). En principio, no parece que la cantidad de DNA a utilizar sea determinante en el proceso, y únicamente sería necesario que la muestra contenga al menos una cadena intacta de DNA que incluya la región a amplificar y en la cual las impurezas estén lo suficiente diluidas como para no inhibir la polimerización. En la práctica, el número de copias mínimo de secuencia molde para que se detecte el producto final tras la amplificación depende de la sensibilidad de cada método y de las condiciones de reacción (Teletchea et al., 2005).

Dado que el rendimiento en DNA es variable dependiendo de la naturaleza de la muestra y del método de extracción, se considera necesario estandarizar la concentración de DNA en los ensayos (Park and Crowley, 2005), cuantificando previamente la cantidad de DNA por un método independiente del sistema empleado en la identificación o cuantificación de DNA como los siguientes:

- Visualización de bandas tras la electroforesis en gel de agarosa: se basa en la comparación de la intensidad de las bandas procedentes de las muestras con las de concentraciones conocidas. Existen programas que integran algoritmos para el procesamiento de imagen bidimensional que están sustituyendo a los que analizaban la banda únicamente en una dimensión (Bajla et al., 2005).

- Espectrofotometría: mediante este método se puede calcular la concentración de ácidos nucleicos en una solución mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. El inconveniente de esta técnica es que no es específica; lo que significa que cualquier DNA que haya contaminado el DNA de interés absorberá luz ultravioleta sobrevalorando el resultado. Además, ni el DNA monocatenario ni los nucleótidos pueden distinguirse de DNA bicatenario por este método. El cociente de absorciones en 260 nm vs. 280 nm es comúnmente utilizada para evaluar la contaminación de DNA de proteínas, en particular, los aminoácidos aromáticos, ya que estos absorben luz a 280 nm (García-Segura et al., 1996).

- Métodos fluorimétricos: con agentes intercalantes fluorescentes que se unen al DNA de doble cadena, como SYBR[®] Green o PicoGreen[®], que permiten detectar hasta 25 pg/ml de DNA (Enger, 1996).

- PCR en tiempo real: la cuantificación mediante este método se desarrollará detalladamente en el punto 2.4.

2.3.2.2 Componentes de la reacción

- DNA polimerasa: a pesar de que existen distintos tipos de DNA polimerasas termoestables con diferentes características, en la mayoría de los métodos de identificación descritos hasta ahora se usa la Taq DNA polimerasa. Es una DNA polimerasa termoestable

con actividad 5'→3' exonucleasa, pero no tiene actividad exonucleasa 3'→5'. Por esto último no es capaz de eliminar los nucleótidos que no están correctamente insertados en la cadena que se forma. También posee una actividad terminal transferasa que ajusta un sólo nucleótido, con frecuencia una A, a las dos extremidades 3'-OH del fragmento amplificado. Existen dos formas de Taq polimerasa disponibles: una enzima nativa purificada de *Thermus aquaticus* y una enzima producida por métodos genéticos en *E. coli* (Myers and Gelfand, 1991). Existen variantes comerciales, como la denominada AmpliTaq[®], una forma modificada por ingeniería genética de la enzima diseñada para *Hot-Start* PCR. Esta polimerasa es inactiva hasta que se incuba 7-10 min. a 95°C por lo que impide totalmente la unión de cebadores no específicos y la formación de dímeros de cebadores durante el tiempo de preparación.

- Los cebadores: son oligonucleótidos de 15-30 bases, los cuales actúan como punto de partida para que la enzima DNA polimerasa alargue sus extremos 3', copiando la cadena complementaria del DNA de la muestra con la que hibridan previamente. Definen los extremos 5' del fragmento amplificado (producto corto de la reacción) ya que es la última base que puede copiar la enzima. La longitud del cebador debe ser lo suficientemente larga como para tener una zona homóloga específica en el genoma con la que hibride de forma estable a la temperatura de anillamiento (Kocher and Wilson, 1991). En principio, los dos cebadores que delimitan el fragmento a amplificar pueden estar muy separados en el genoma ya que la reacción puede amplificar fragmentos de hasta varias kilobases de longitud. En la práctica, se seleccionan las posiciones más próximas que permitan cada uno de los métodos de análisis, ya que la amplificación es más eficiente y robusta cuanto menor es el tamaño del amplicón. Como regla general se seleccionan cebadores teniendo en cuenta las siguientes premisas (Saiki et al., 1988):

- i.* Seleccionar cebadores con un contenido en G y/o C de al menos el 50% para facilitar la unión al DNA molde a temperatura relativamente alta que impida las uniones inespecíficas.

- ii.* Evitar la presencia de regiones con largas secuencias de una sola base, así como secuencias que puedan producir estructuras secundarias internas o que sean complementarios entre sí, especialmente en sus extremos 3', ya que podrían dar lugar a la formación de los denominados dímeros de cebadores (también conocidos por su denominación en inglés, primer-dimer) . Cuando los extremos 3' de los cebadores hibridan, se forma dicho artefacto que al ser polimerizado por la enzima, reduce la eficiencia de la amplificación (figura 3).

- iii.* Se debe evitar, además, la presencia de tres G ó C cerca del extremo 3'.

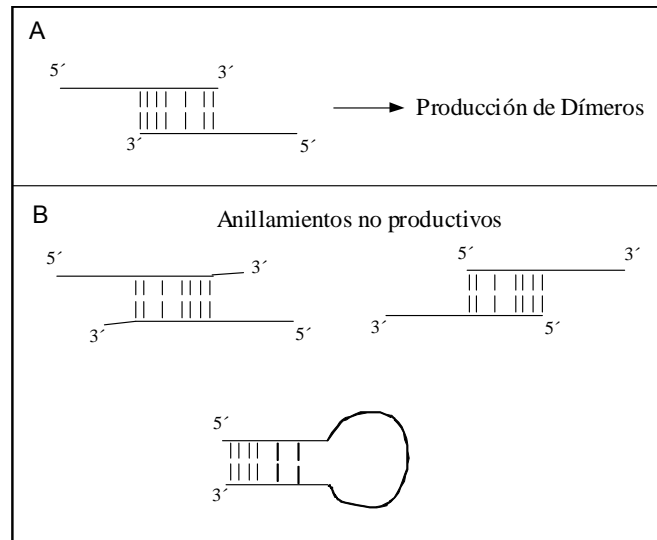


Figura 3. Ejemplos de anillamientos incorrectos producidos por: (A) complementariedad de secuencias entre cebadores, dejando un extremo 3' disponible para elongación de secuencia y que puede producir formación de dímeros durante la amplificación; (B) complementariedad de secuencias entre los cebadores directo y reverso o formación de estructuras tallo-lazo, lo que da lugar a anillamientos improductivos que detraen en la reacción de PCR moléculas de cebador disponibles para la amplificación.

Los cebadores suelen utilizarse a una concentración entre 0.1-1.0 μM lo que disminuye el riesgo de formación de productos inespecíficos y de artefactos (dímeros de cebadores). Concentraciones más elevadas pueden provocar el inicio en lugares ectópicos con la consiguiente amplificación de secuencias no diana, y por el contrario, el PCR es extremadamente ineficaz cuando la concentración del cebador es limitante.

- Ión Magnesio (Mg^{2+}): la concentración de magnesio afecta a los siguientes aspectos de la reacción de PCR (Kocher and Wilson, 1991): *i.* Hibridación del cebador con el DNA molde; *ii.* Temperatura de disociación de las cadenas, tanto de DNA molde como de los productos del PCR, por lo que afecta a la especificidad de los productos del PCR; *iii.* Continuidad de la actividad de la DNA polimerasa. La carencia de Mg^{2+} puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad y puede incrementar las uniones inespecíficas y la formación de artefactos, como por ejemplo dímeros de cebadores (Eckert and Kunkel, 1990).

Aunque en la mayoría de los métodos de identificación de especies que utilizan PCR se mantiene una concentración de ión magnesio estándar de 2.5 mM, existen algunos casos en los que condiciones particulares de hibridación obligan a optimizar experimentalmente su concentración.

Por otra parte, la presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u otros quelantes en la solución de DNA molde pueden afectar a la cantidad de Mg^{2+} libre, enmascarando la concentración de Mg^{2+} óptima para la reacción (Innis et al., 1999).

2.3.2.3 PCR múltiple

Una variante de la técnica de PCR es la realización de reacciones múltiplex, donde se emplean dos o más pares de cebadores en único tubo con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de DNA diana permitiendo la detección e identificación de distintos genes de interés, lo cual necesariamente implica que la mezcla de reactivos y el programa utilizado sean adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás (Vet and Marras, 2005). Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de cebadores, y el tipo y la cantidad de DNA polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. En el caso de los cebadores, se trata de minimizar en lo posible el número necesario generalmente mediante el diseño de un cebador común y otro específico para las especies a analizar (Weibin et al., 2009).

2.3.3 Utilización de sondas fluorescentes para PCR en tiempo real

Las técnicas basadas en PCR son muy sensibles, detectando niveles que no se apreciaban usando otros métodos. Sin embargo, esa sensibilidad es una desventaja cuando la legislación del etiquetado permite cierto grado de contaminación. Un argumento muy común en contra del uso de las técnicas basadas en PCR es que es demasiado sensible y trazas de material pueden dar falsos positivos (Sawyer et al., 2003). Por otra parte el uso de métodos de PCR clásicos no permite la cuantificación del DNA en la muestra de una forma sencilla y robusta, por lo que éstos sólo son adecuados en aplicaciones cualitativas. Por esto, en los últimos años se ha extendido el uso de técnicas de PCR en tiempo real o *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR), que difiere de la PCR clásica en que permite el análisis continuo de la amplificación del DNA y que fue puesta a punto en 1993 (Higuchi et al., 1993). Se basa en la detección de fluorescencia asociada a cada ciclo de amplificación de la reacción de PCR, lo que permite obtener una cinética del incremento de fluorescencia de la que se pueden calcular datos cuantitativos, absolutos o relativos, del número de copias de DNA molde inicial en la mezcla de reacción (Brodmann and Moor, 2003). Además, el ciclo de amplificación que se toma para realizar los análisis presenta la ventaja de que ningún componente se encuentra limitando el transcurso de la reacción por lo que la amplificación se encuentra en su fase exponencial (Heid et al., 1996). Los métodos de PCR en tiempo real se han convertido en la tecnología más ampliamente utilizada para la detección y cuantificación de DNA por contar con una enorme sensibilidad, ser muy específico de la secuencia, no llevar asociado procesamientos post-amplificación y lograr un mayor rendimiento de muestra (Wong and Medrano, 2005). El uso del PCR en tiempo real presenta la ventaja de permitir la realización de medidas en un estado de amplificación temprano consiguiendo mayor precisión que los análisis a tiempo final y la posibilidad de prescindir del análisis electroforético de los productos del PCR (Bustin et al., 2005). Además, mediante el uso de sondas o intercalantes fluorescentes se pueden diseñar amplicones muy cortos, lo que es crítico cuando se analiza DNA procedente de muestras forenses deterioradas o alimentos procesados (Wittwer et al., 1997b). Cuanto se utilizan

sondas fluorescentes se logra un aumento en la especificidad de la señal recogida en la reacción, y habitualmente no es necesario llevar a cabo ningún análisis posterior para completar la identificación (Heid et al., 1996). La disponibilidad de diferentes fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda permite, además, diseñar de forma sencilla sistemas múltiplex en los que se analizan simultáneamente hasta cuatro marcadores en la misma mezcla de reacción. Finalmente, el hecho de que el ciclo en el que se alcanza un nivel de fluorescencia determinado es inversamente proporcional al número de copias inicial de DNA molde en la reacción (como se verá en el punto 2.4) permite realizar medidas cuantitativas (Higuchi et al., 1993).

En la industria alimentaria, el qPCR se ha empleado fundamentalmente para la identificación y cuantificación de material procedente de organismos genéticamente modificados (OGM) en alimentos (Di Pinto et al., 2008; Hernández et al., 2003). En cuanto a la autenticación de diferentes especies, se han llevado a cabo numerosos ensayos en diferentes productos: cárnicos, pesqueros, lácteos así como en harinas y piensos para alimentación animal. En la tabla 1 se indican algunos estudios representativos de este tipo de análisis.

En el desarrollo de la reacción de la qPCR se diferencian tres etapas: la desnaturalización del DNA, la hibridación de los cebadores y sondas y la extensión o polimerización 5'→3'. La cuantificación de las muestras se realiza durante la fase exponencial (Heid et al., 1996), donde la eficiencia de la reacción es del 100%, ya que en esta fase la cantidad de producto acumulado se duplica en cada ciclo de amplificación. Se pueden utilizar diversos sistemas para el seguimiento en tiempo real de la amplificación por PCR basados en fluorescencia: agentes intercalantes, sondas de hidrólisis, sondas de hibridación o sondas con estructura de horquilla (Wittwer et al., 1997a). La elección de la química de la sonda tiene un impacto sobre la sensibilidad de ensayos de PCR y debe considerarse en una estrategia de optimización (Josefsen et al.).

Tabla 1. Métodos de detección de especies en alimentos mediante qPCR, indicando el tipo de producto analizado, la/s especie/s diana de la amplificación y la tecnología de sondas utilizada.

Productos	Especies	Tecnología	Referencia
Cárnicos	vaca y cerdo	TaqMan [®]	(Laube et al., 2003)
	vaca	Scorpion primer/ SYBR [®] Green	(Sawyer et al., 2003)
	vaca, cerdo, pollo y rumiantes	SYBR [®] Green	(Walker et al., 2003)
	caballo, perro, gato, rata, hámster, conejillo de Indias y conejo, aves y rodentia	SYBR [®] Green	(Walker et al., 2004)
	vaca, cerdo, oveja, pollo y pavo	TaqMan [®]	(Dooley et al., 2004)
	pato	TaqMan [®]	(Rodríguez et al., 2004)
	caballo y burro	TaqMan [®] MGB	(Chisholm et al., 2005)
	cerdo	TaqMan [®]	(Rodríguez et al., 2005)
	15 tejidos del sistema nervioso central bovinos	TaqMan [®] MGB	(Schönenbrücher et al., 2007)
	vaca, cerdo, cordero, cabra, pollo y avestruz	TaqMan [®]	(Laube et al., 2007a)
	vaca, cordero, cerdo, pollo y caballo	TaqMan [®] MGB	(Tanabe et al., 2007)
	vaca, oveja, cerdo, caballo, pollo y pavo	TaqMan [®]	(Jonker et al., 2008)
	vaca, cerdo, pollo y pavo	TaqMan [®]	(Köppel et al., 2008)
	ciervo, gamo y corzo	SYBR [®] Green	(Fajardo et al., 2008b)
	rebeco y cabra	TaqMan [®]	(Fajardo et al., 2009)
	burro, cerdo y caballo	TaqMan [®]	(Kesmen et al., 2009)
	vaca, cerdo, pollo, pavo, caballo, oveja y cabra	TaqMan [®]	(Köppel et al., 2009)
avestruz	SYBR [®] Green/ TaqMan [®]	(Rojas et al., 2011)	
Pesqueros	abadejo (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	TaqMan [®]	(Hird et al., 2005)
	mero (<i>Epinephelus</i> and <i>Mycteroperca</i> species)	SYBR [®] Green	(Trotta et al., 2005)
	atún (<i>Thunnus alalunga</i> y <i>Thunnus</i> <i>albacares</i>)	TaqMan [®]	(López and Pardo, 2005)
	merluza (<i>Merluccius merluccius</i>)	TaqMan [®] MGB	(Sánchez et al., 2009)
	Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	TaqMan [®]	(Herrero et al., 2010)
Lácteos	vaca	TaqMan [®]	(López-Calleja et al., 2007b)

Productos	Especies	Tecnología	Referencia
	cabra	TaqMan [®]	(López-Calleja et al., 2007a)
	vaca	TaqMan [®]	(Zhang et al., 2007a)
	vaca y búfalo	TaqMan [®]	(Dalmasso et al., 2011)
	vaca	TaqMan [®]	(Lahiff et al., 2002)
Harinas y piensos	vaca y mamíferos	TaqMan [®]	(Brodmann and Moor, 2003)
	rumiantes	TaqMan [®]	(Mendoza-Romero et al., 2004)
	vaca	LightCycler [™]	(Rensen et al., 2005)
	vaca, cordero, cerdo y pollo	TaqMan [®]	(Krcmar and Rencova, 2005)
	vaca, oveja y cabra	LightCycler [™]	(Rensen et al., 2006)
	vaca y cerdo	TaqMan [®]	(Fumiere et al., 2006)
	vaca, oveja, cerdo y pollo	SYBR [®] Green	(Frezza et al., 2008)
	cerdo	SYBR [®] Green	(Martín et al., 2009b)
	pescado	TaqMan [®] MGB	(Benedetto et al., 2011)

A continuación se detallan las opciones de sondas más utilizadas de las disponibles en el mercado:

2.3.3.1 Agentes intercalantes en la molécula de DNA

Son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen a DNA de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR[®] Green (Wittwer et al., 1997b). SYBR[®] Green es un fluorocromo del grupo de las cianinas que se une al surco menor del DNA de doble cadena, principio por el cual se puede hacer seguimiento del transcurso de la amplificación como se muestra en la figura 4. El producto sintetizado en cada ronda de amplificación puede visualizarse de forma continua, siendo la intensidad de luz emitida proporcional a la cantidad de complejo SYBR[®] Green-DNA en la solución (Wittwer et al., 1997a). La gran ventaja que presenta es que al unirse a cualquier DNA de doble cadena, no requiere el diseño ni la optimización de las sondas marcadas. Por lo tanto, en cuanto se tiene un ensayo PCR diseñado, se puede llevar a cabo en tiempo real. Es la opción más sencilla y económica para la detección con PCR en tiempo real. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es que no dan información sobre la especificidad de la reacción, sin distinguir entre productos de reacción específicos de los inespecíficos (como los dímeros de oligonucleótidos), con lo que existe la probabilidad de detección de falsos positivos. Por tanto, la sensibilidad del SYBR[®] Green detección está limitada por la formación de productos inespecíficos (Wittwer et al., 1997a).

Por este motivo, la mayoría de los protocolos que usan esta aproximación toman precauciones adicionales y se apoyan para confirmar los resultados de medida de fluorescencia del PCR en análisis de los productos por electroforesis. Algunos autores proponen el uso de las curvas de fusión de los productos de PCR. SYBR[®] Green permite distinguir las señales obtenidas a partir de distintos productos de PCR y así diferenciar unos fragmentos de otros mediante el estudio de sus distintas temperaturas de fusión (T_m = temperatura a la que el 50% de la molécula de DNA está desnaturalizada). Al separarse las dos cadenas al alcanzar la T_m se produce una disminución de la fluorescencia, que puede medirse y asociarse a cada producto de reacción (Ririe et al., 1997). De esta forma se asegura la identificación del producto amplificado que ha sido detectado (Hernández et al., 2003). Esta aproximación puede ser más conveniente que el análisis mediante electroforesis, al evitar operaciones manuales post-amplificación.

Algunos de los protocolos propuestos usan reacciones de PCR múltiples permitiendo la detección de dos o más especies (Trotta et al., 2005) o de material transgénico (Hernández et al., 2003) en la misma reacción de amplificación. Dado que existe una correlación entre la altura del pico de la curva de fusión del amplicón (o el área debajo del pico) y el número de copias de DNA diana en la reacción, sería posible estimar las proporciones de cada especie de DNA en la mezcla (Wilhelm et al., 2003).

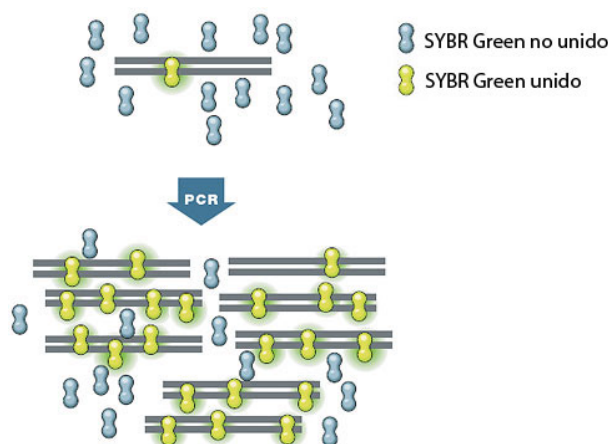


Figura 4. Detección de la amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (SYBR[®] Green). El colorante se une al surco menor del ADN bicatenario, pero no al ADN monocatenario. Como consecuencia de esta unión, se produce un incremento de la señal fluorescente (representado en color verde). Debido al aumento de la cantidad de ADN recién sintetizado tras cada ciclo del PCR, la emisión de fluorescencia aumenta en proporción al número de moléculas del DNA bicatenario presentes en la mezcla.

2.3.3.2 Sondas de hidrólisis

Las sondas de hidrólisis se basan en el fenómeno de la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia o tecnología FRET (Clegg, 1995). Las sondas de hidrólisis

TaqMan[®] (Holland et al., 1991) son las más utilizadas en los métodos descritos de PCR en tiempo real. La tecnología TaqMan[®] está basada en la actividad 5'→3' de la Taq polimerasa y en la utilización de una sonda doblemente marcada. Las sondas son secuencias de oligonucleótidos cortas marcadas con una molécula fluorescente en su extremo 5' y otra molécula apantalladora de fluorescencia en 3', cuyos espectros de excitación y emisión solapan, por lo que cuando están próximas producen el fenómeno de extinción de fluorescencia o quenching por FRET. De esta forma, cuando la sonda está intacta no se produce la emisión de fluorescencia, sin embargo, cuando hibrida con su molde de DNA complementario y es hidrolizada por la actividad exonucleásica 5'→3' de la Taq polimerasa en su avance para generar el producto de amplificación, se emitirá fluorescencia (figura 5). El incremento de la fluorescencia estará en relación directa con la aparición del producto amplificado (Heid et al., 1996).

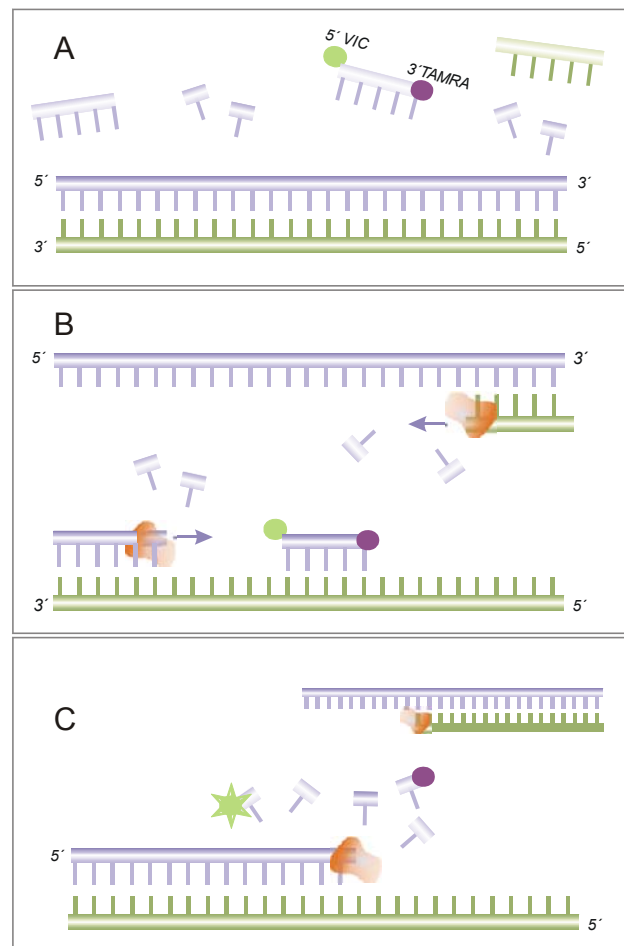
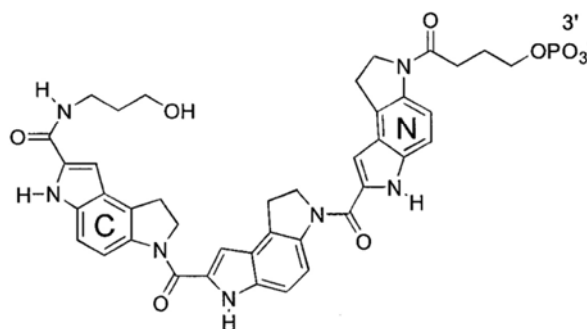
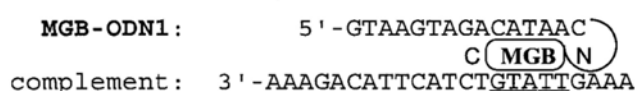


Figura 5. Mecanismo de acción de sondas de hidrólisis tipo TaqMan[®] en el PCR en tiempo real. A. La reacción contiene inicialmente los cebadores, nucleótidos y la sonda marcada en 5' con un fluorocromo (VIC) y en 3' con un amortiguador de fluorescencia (TAMRA). B. La sonda y los cebadores se unen al DNA diana y se inicia la síntesis de la cadena de DNA. C. La actividad 5'→3' exonucleasa de la Taq polimerasa hidroliza la sonda en su avance para generar el producto de amplificación. Al separarse los fluoróforos se produce la consiguiente emisión de fluorescencia. Como consecuencia, el número de moléculas que emiten fluorescencia aumenta en la misma medida que se produce la amplificación del DNA diana.

Los protocolos habituales para el uso de las sondas TaqMan® en el PCR en tiempo real, requieren que su T_m , resulte 10° C por encima de la T_m de los cebadores. Para cumplir este requisito, la sonda debe alcanzar aproximadamente 27 nucleótidos. Esto puede suponer una dificultad que obstaculiza el uso de la sonda para la discriminación de grupos de especies ya que puede ser difícil encontrar una región conservada de DNA en la que se den todos los requisitos para los cebadores y la sonda se encuentren espaciados adecuadamente. Una forma de eludir el uso de sondas de hidrólisis largas es la utilización de oligonucleótidos modificados por unión de moléculas que aumentan la afinidad por el surco menor del DNA (sondas MGB, del inglés minor groove binding, representadas en la figura 6, permitiendo reducir el tamaño de la sonda hasta tamaños de 13 a 16 nucleótidos (Afonina et al., 1997).



MGB = 3' DPI₃ and N-terminal linker

Figura 6. Esquema del dúplex de DNA formado con la sonda MGB y un oligonucleótido de 23 bases. La región que se encuentra subrayada corresponde a la zona en la que el tripéptido dihidrociclopirroloindol DPI₃ encaja en el surco menor del DNA bicatenario. C y N indican la posición de los extremos carboxilo y amino del tripéptido. Debajo se muestra la estructura de la molécula DPI₃ (Kutyavin et al., 2000).

2.3.3.3 Sondas de hibridación en tándem

Las sondas de hibridación tipo tándem (Heid et al., 1996; Wittwer et al., 1997b), están constituidas por dos oligonucleótidos complementarios al DNA diana en regiones adyacentes en disposición cabeza-cola marcados cada uno con fluorocromos cuyos espectros de emisión y excitación solapan. Cuando ambos se unen al DNA diana en la etapa del PCR de la hibridación de los cebadores, el donador es excitado por una fuente de luz externa pasando al fluorocromo aceptor adyacente parte de su energía mediante interacciones dipolo-dipolo, la emisión se registrará a una longitud de onda distinta. La cantidad de luz emitida será proporcional al número de sondas unidas al DNA complementario, que se incrementa con cada ciclo de PCR (Heid et al., 1996). Un esquema del sistema de sondas en tándem se muestra en la figura 7.

2.3.3.4 Sondas de horquilla (*Molecular Beacons*)

Las sondas con estructura de horquilla (*Molecular Beacons*), poseen secuencias repetidas invertidas (ITR) en sus extremos permitiendo que formen una estructura de horquilla por complementariedad de las regiones invertidas (Abravaya et al., 2003; Tan et al., 2004; Tyagi and Kramer, 1996). Esta estructura secundaria lleva unidos de manera covalente en cada extremo, un fluorocromo y una molécula apantalladora de fluorescencia o *quencher*, produciéndose entre ellos el fenómeno FRET. La zona del tallo tiene secuencias que hibridan para mantener la estructura, y la zona del bucle presenta la secuencia específica del DNA diana. La unión de la sonda al DNA es dependiente de la temperatura, de forma que a la temperatura de fusión, si está presente en la muestra la secuencia diana del bucle de la sonda, ésta sufrirá un cambio de conformación despegando su tallo y uniéndose a su DNA complementario. Al alejarse el fluorocromo del *quencher* se registrará un aumento de fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado. Al igual que las sondas FRET, en las sondas horquilla la DNA polimerasa empleada no presenta actividad 5'→3' ni 3'→5' exonucleasa. Su principal ventaja es que el sistema es altamente específico (las dianas han de ser exactamente complementarias) ya que al ser competitivo entre dos secuencias que dan lugar a distintas conformaciones, se ha de producir un cambio conformacional para la hibridación con la secuencia específica. Además, ofrecen la posibilidad de combinarlas con distintos agentes fluorescentes para identificar varias secuencias diana en la misma reacción (Múltiplex). Sin embargo, tienen el inconveniente de requerir secuencias largas y tener una gran dependencia de la temperatura de hibridación.

Se han desarrollado otras variantes basadas en estructura de horquilla, como el sistema ScorpionTM, que utiliza cebadores que incorporan en el extremo 5' un bucle que mantiene próximos a un fluorocromo y un *quencher*. El cebador se diseña de forma que, en parte del lazo, contiene una secuencia complementaria a la región 3' de la misma cadena en el DNA diana, de forma que, una vez extendida la secuencia por la polimerasa, se forma una estructura de bucle extendido que aleja el fluorocromo del *quencher*, registrándose la fluorescencia (Whitcombe et al., 1999). El sistema AmplifluorTM (Nazarenko et al., 1997; Uehara et al., 1999) usa una aproximación similar con un cebador en estructura de horquilla que contiene el fluorocromo y el *quencher*, pero no requiere situar una secuencia complementaria en la región de la horquilla, ya que es la propia progresión de la síntesis de la cadena complementaria a partir del segundo cebador la que da lugar a la pérdida de la estructura y el alejamiento de las moléculas fluorescentes.

Se han realizado varios estudios comparativos con estos sistemas de detección de amplificación en tiempo real (Gasparic et al., 2010; Josefsen et al.) y, si bien los resultados pueden ser excelentes en todos ellos, los métodos basados en sondas o cebadores en horquilla pueden plantear algunas dificultades debido a la complejidad del diseño de las secuencias y su dependencia de un ajuste muy exacto de la temperatura de hibridación y de lectura de fluorescencia.

En la figura 7 se muestra un esquema-resumen de los sistemas de detección de fluorescencia en PCR en tiempo real.

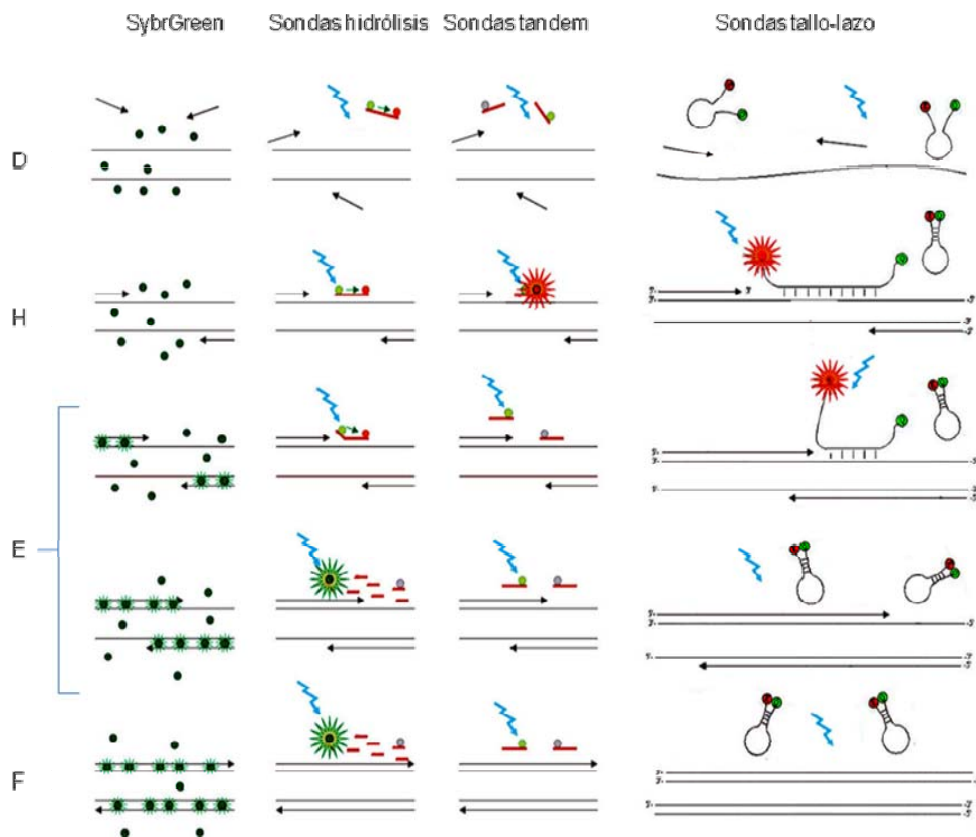


Figura 7. Comparación de las fases de ciclo de amplificación (D: desnaturalización; H: hibridación; E: extensión; F: final tras el ciclo) y detección de fluorescencia en los sistemas de PCR en tiempo real más utilizados. SYBR® Green, (ver también figura 4; Sondas de hidrólisis: ver también figura 5; Sondas Tandem: marcadas con fluoróforos aceptor y donante respectivamente, se unen durante la etapa de la hibridación de los cebadores. El fluoróforo donador es excitado por una fuente de energía externa transfiriendo parte de su energía de excitación al fluoróforo aceptor adyacente que emite la señal fluorescente; Sondas Tallo-Lazo: sus extremos 5' y 3' se encuentran unidos covalentemente a un fluoróforo y a un inhibidor próximo. En la etapa de la hibridación, en presencia de la secuencia complementaria, se despliega alejándose el fluoróforo del inhibidor e iniciando su fluorescencia.

2.4 Cuantificación

La principal ventaja del uso del PCR en tiempo real es la posibilidad de cuantificar el DNA de partida gracias al registro del aumento de fluorescencia por la hidrólisis de la sonda en el transcurso de los ciclos de PCR. La cuantificación se realiza comparando el número de ciclo, C_T , en el cual la muestra problema alcanza un mismo nivel de fluorescencia que una muestra patrón, cuya concentración inicial o número de copias de DNA es conocida. Si en cada ciclo de PCR se duplica el número de moléculas y, por tanto, la fluorescencia registrada, el valor C_T debe ser proporcional al número de copias de DNA inicial en la

muestra. En la figura 8 se muestra el incremento en fluorescencia registrado durante el progreso de un PCR en tiempo real y la relación entre los valores de C_T de dos muestras que parten de distinto número de copias de DNA diana.

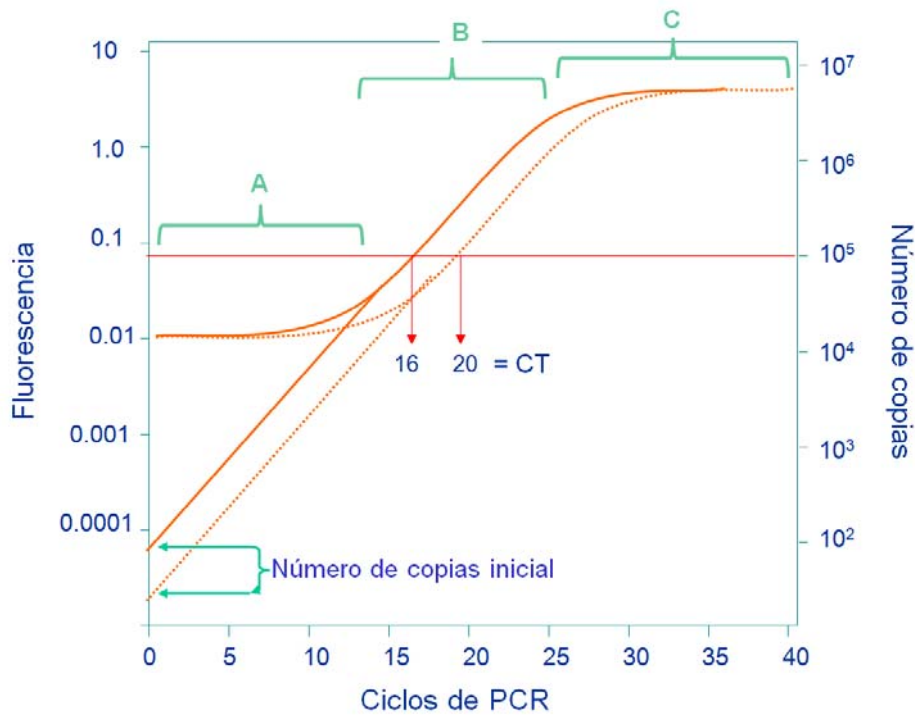


Figura 8. Esquema de las diferentes etapas de la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real. En A sólo se detecta fluorescencia de fondo. En los ciclos incluidos en B se observa incremento exponencial de fluorescencia y es posible realizar medidas tanto cualitativas como cuantitativas. En C la reacción ha llegado a saturación o agotamiento de los reactivos, el nivel de fluorescencia se iguala independientemente de la cantidad de DNA de partida y la medida sólo es relevante como dato cualitativo (tiempo final). Para la medida cuantitativa de DNA en dos muestras (líneas — y), se establece un nivel de fluorescencia de referencia (línea —). El C_T de cada muestra es el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el nivel de referencia, y es proporcional al número de copias de DNA iniciales en la reacción.

El número de copias de DNA cuando se alcanza el nivel de fluorescencia de referencia, N_{CT} , será proporcional al número de copias inicial, N_i , según la ecuación:

$$N_{CT} = N_i \times 2^{CT}$$

Donde N_{CT} es el número de copias de DNA cuando se alcanza la fluorescencia de referencia y N_i es el número de copias de DNA diana inicial. Se puede obtener una representación lineal rescribiendo la ecuación (Higuchi et al., 1993):

$$\log N_{CT} - \log N_i = C_T \log 2$$

y

$$C_T = -(1/\log 2)\log N_i + \frac{\log N_{CT}}{\log 2}$$

de forma que la representación de cada obtenido con una cantidad N_i de DNA debe producir una recta cuya pendiente es $-1/\log 2$ y el punto de corte con el eje C_T es $\log N_{CT}/\log 2$. Dado que, experimentalmente, la cantidad de DNA producida en cada ciclo puede no ser exactamente el doble de la presente en el ciclo previo, se puede proponer una forma más general de la ecuación anterior:

$$C_T = -(1/\log E)\log N_i + \frac{\log N_{CT}}{\log E}$$

En la que E es la eficiencia de la reacción de PCR, es decir, el número de copias medio de producto de reacción por ciclo de PCR. Las eficiencias del PCR en tiempo real pueden ser calculadas experimentalmente a partir del dato de la pendiente en una representación de C_T frente al logaritmo de la cantidad de DNA inicial, en una serie de reacciones realizadas con diferentes cantidades del mismo DNA diana haciendo diluciones seriadas. El cálculo de la eficiencia de PCR es importante en los métodos de cuantificación, ya que permite realizar comparaciones entre datos obtenidos a partir de amplicones distintos. E se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

El método de cuantificación elegido depende de la secuencia diana que se pretende amplificar, el intervalo esperado de cantidad de DNA presente en el tejido, el grado de exactitud requerido, y el tipo de cuantificación que se vaya a llevar a cabo. En general, dos tipos de cuantificación son posibles: la cuantificación absoluta y la relativa, en la cual se obtiene una relación del número de copias de un DNA diana respecto a otro que se utiliza de referencia. El uso de una u otra aproximación depende de los requerimientos de cada aplicación.

2.4.1 Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta proporciona una valoración de la cantidad de DNA diana presente en la muestra. Para su cálculo es necesario realizar una curva de calibración con DNA de referencia cuantificado por un método independiente para relacionar la señal obtenida de la muestra con el número de copias fijo de la curva estándar. Aunque en ocasiones se indica como cuantificación absoluta un resultado obtenido en unidades de masa de DNA, en sentido estricto, mediante PCR en tiempo real, sólo es posible cuantificar el número de copias de DNA diana presente al inicio de la reacción. Por tanto, la cuantificación absoluta debe expresarse en número de copias del DNA diana (Morrison et al., 1998). El problema fundamental de la cuantificación absoluta es que proporciona una valoración del número de copias de DNA diana en la muestra, pero no cuantifica la cantidad

de material presente, ya que el contenido en DNA por unidad de masa puede variar dependiendo de la naturaleza del material utilizado (tejidos, órganos etc.). Además, requiere un método independiente para conocer el número de copias de DNA diana por unidad de masa en el patrón para realizar la recta de calibración. Esto no siempre es sencillo, ya que requiere conocer con precisión el tamaño de la molécula de DNA. Frecuentemente se recurre a la construcción de plásmidos que contienen el fragmento de DNA a detectar clonado para disponer de un dato más preciso para el cálculo del peso molecular, lo que se traduce en un coste adicional para la realización de este tipo de ensayos.

Para usar las curvas de calibración es necesario comprobar que las eficiencias del DNA estándar y el de la muestra sean comparables (Ferre, 1992; Souaze et al., 1996). El diseño de las curvas estándar, su preparación, la determinación exacta de sus concentraciones, su estabilidad a largo plazo y su almacenamiento son factores que pueden afectar a los resultados ya que la cuantificación del DNA en el PCR en tiempo real depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2008). Entre los principales tipos de estándares utilizados, se demostró como los números de copia variaban durante el almacenaje (de 0 a 14 días) siendo las secuencias clonadas más estables que los productos de PCR. Por tanto es conveniente analizar rutinariamente los estándares utilizados ya de lo contrario podrían conducir a la variación sustancial en los resultados (Dhanasekaran et al.).

Los métodos de cuantificación absoluta se utilizan en aplicaciones que requieren conocer el número de copias del DNA diana, como es el caso de la cuantificación de carga viral/bacteriana o la presencia y cuantificación de transgénicos en alimentos (Cattori and Hofmann-Lehmann, 2008; Workenhe et al., 2008). Esta cuantificación por PCR en tiempo real usualmente pretende la determinación del porcentaje del material investigado dentro del conjunto que constituye la muestra a analizar. En el caso de transgénicos los resultados se expresan como porcentaje de material transgénico (construcción específica) frente a no transgénico de la misma especie (European Commission, 2004). Para ello se realizan dos rectas de calibrado con materiales de referencia, una para el transgén y otra para un gen endógeno de la misma especie, con cantidades conocidas de DNA en número de copias. Extrapolando los valores de C_T para ambos detectores obtenidos con la muestra problema, y conociendo el número de copias por genoma del transgén en el evento, es posible conocer la relación de material transgénico frente al no transgénico en la muestra. Esta estrategia se podría en principio trasladar al caso de cuantificación de especies. Este objetivo no es fácil de alcanzar ya que, al contrario que en caso de transgénicos, el material a comparar es DNA de distintas especies, lo cual dificulta el uso de genes endógenos que sirvan de referencia. Aunque no hay unanimidad en la forma de expresar los resultados en el caso de comparación entre especies distintas, la más adecuada sería obtener el porcentaje de la especie analizada en la muestra. La alternativa más utilizada es referir la cantidad de DNA de la especie analizada a la cantidad de DNA total utilizada en la reacción. En algunos casos, la medida de DNA total se ha realizado por métodos independientes,

como espectrometría mediante luz ultravioleta (Walker et al., 2003); Walker, 2004 #744; Zhang, 2007 #2333}. Sin embargo, para obtener medidas más precisas y fiables es necesario utilizar una referencia interna similar a la utilizada en cuantificación de transgénicos. Este DNA de referencia puede ser cuantificado con detectores que amplifican grupos amplios de especies, por ejemplo mamíferos, para sistemas de detección específicos de porcino (Rodríguez et al., 2005) o bovino (Brodmann and Moor, 2003). Una alternativa al uso de DNA como referencia interna es utilizar matrices estandarizadas, tales como salchichas con distintos contenidos de carne de distintas especies, y elaborar rectas estándar a partir del DNA obtenido de estas matrices, en lugar de diluciones seriadas de un DNA de referencia. De esta forma, los C_T obtenidos de la muestra problema se extrapolan directamente sobre las rectas, obteniéndose directamente la proporción de material cárnico de cada especie en la muestra. El método ha mostrado ser útil en ensayos interlaboratorio (Eugster et al., 2009; Köppel et al., 2008), pero es totalmente dependiente de disponer de las matrices adecuadas para cada tipo de ensayo.

2.4.2 Cuantificación relativa

La cuantificación relativa compara la cantidad de DNA presente en una muestra en relación a la cantidad de otro DNA que se utiliza como referencia (Raeymaekers, 1993). No es necesario conocer las cantidades absolutas ni las concentraciones de ninguno de los DNAs que se analizan. Las rectas de calibración se utilizan para establecer las eficiencias de amplificación de los dos detectores que se comparan, pero no se utilizan para extrapolar las cantidades de DNA en la muestra. La cuantificación relativa tiene un uso extendido en aplicaciones de expresión génica, donde se utilizan genes constitutivos para la normalización de las medidas realizadas (She et al., 2009). Estos genes suelen codificar proteínas esenciales para el funcionamiento de las células, por lo que su expresión es menos variable que la de otros genes, pudiéndose considerar como constante en las condiciones en las que se pretende realizar la medida de expresión génica (Thellin et al., 1999). De forma general, la relación R de la expresión de un gen X en dos condiciones (A y B) se obtiene con la expresión:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Donde $\Delta\Delta C_T$ es igual a $(C_T^{\text{referencia condición A}} - C_T^{\text{gen X condición A}}) - (C_T^{\text{referencia condición B}} - C_T^{\text{gen X condición B}})$. En el caso de la cuantificación de DNA en muestras de alimentos para determinar el contenido de las diferentes especies, en principio se puede utilizar una aproximación similar. Para cada especie se diseña un detector específico, constituido por una pareja de cebadores (más la sonda fluorescente, según la química elegida), y se diseña un tercer detector que sea común a ambas especies y que se usa como referencia. Si las eficiencias de reacción de los tres detectores son iguales, se puede obtener un valor $\Delta C_T = C_T^{\text{especie}} - C_T^{\text{referencia}}$ para cada especie, y el contenido en porcentaje (%) de la especie mediante: $\% = 2^{-\Delta C_T} \times 100$. Esta aproximación se ha utilizado para desarrollar un método de cuantificación de especies de atún en conservas (López and Pardo, 2005).

Un caso particular, que toma elementos de la cuantificación absoluta y relativa, es la obtención de datos semi-cuantitativos para realizar determinaciones del tipo presencia/ausencia. En este caso, lo que se pretende es determinar si el contenido de una especie en la muestra supera o no una cantidad o porcentaje determinado. Los resultados se emiten como positivo o negativo, junto con un valor que especifica el límite de detección. Así, si el límite de detección se establece en un 5%, toda muestra que contenga menos del 5% de la especie analizada se calificará como negativa y si supera ese nivel se calificará como positiva. La metodología de qPCR se puede adaptar fácilmente a esta situación, tanto mediante medidas de fluorescencia en la fase exponencial como a tiempo final. Los sistemas se validan con muestras que contienen la especie a analizar en el entorno del umbral, y se establecen unos valores de ΔC_T que, teniendo en cuenta la incertidumbre asociada, permitan diferenciar entre las dos situaciones. Este tipo de aproximación se usa rutinariamente en la detección de eventos transgénicos que superan el 0.9% en alimentos en Europa. También se ha propuesto un sistema similar para la detección de las especies cárnicas más importantes con un umbral del 0.5% total (Dooley et al., 2004).

En la tabla 2 se indican algunos de los ensayos publicados de análisis mediante qPCR de especies en alimentos, en los que se aportan datos cuantitativos sobre el contenido en las especies indicadas con relación a distintos materiales de referencia o calibradores.

Tabla 2. Estudios en los que se han ensayado métodos de qPCR para obtener datos cuantitativos sobre la composición en mezclas de especies de interés en alimentación

Referencia	Dianas	Especies (cebadores específicos)	Sondas	Muestra	Control endógeno / calibrado
(Laube et al., 2007a; Laube et al., 2007b)	Fosfodiesterasa, receptor rianodina, GMPc, Interleukina2	8 especies mamíferos y aves	8 especies mamíferos y aves	Mezclas DNA	Miostatina, mamíferos y aves
(Köppel et al., 2008)	Beta-actina, receptor de Prolactina, <i>cytB</i> , Factor de crecimiento transformante beta 3	Bovino, porcino, pollo	Bovino, porcino, pollo, pavo	Mezclas DNA	Calibrador adaptado a matriz
(Fajardo et al., 2008b)	12S/18S	Ciervo	SYBR [®] Green	Mezclas carne	Consenso Eucariota
(Fajardo et al., 2008a; Fajardo et al., 2009)	12S/18S	Caprino	SYBR [®] Green, Caprino	Mezclas carne	Consenso Eucariota
(Köppel et al., 2011; Köppel et al., 2008; Köppel et al., 2009)	Beta-actina, receptor de Prolactina, <i>cytB</i> , Factor de crecimiento transformante beta 3	8 especies mamíferos y aves	8 especies mamíferos y aves	Mezclas carnes, Mezclas DNA	Calibrador adaptado a matriz
(Martín et al., 2009b)	12S/18S	Porcino	SYBR [®] Green	Mezclas carne/ vegetal, piensos	Consenso Eucariota



3. Justificación y Objetivos



En los últimos años se ha producido un aumento en el interés por conocer el origen y composición de los productos alimenticios, más concretamente el contenido en las especies animales declaradas, así como las cantidades presentes en productos elaborados. Las crisis alimentarias debidas a enfermedades transmitidas por los alimentos han desembocado en exigencias de calidad y seguridad por parte de la Comunidad Europea para controlar la veracidad del etiquetado. A fin de asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria y proteger la salud del consumidor, así como para brindar protección contra fraudes, es necesario innovar e introducir mejoras constantes en los sistemas nacionales de control. Esto ha motivado el desarrollo de métodos de análisis que permitan la detección y cuantificación de especies en todo tipo de productos elaborados para la alimentación humana y animal.

Actualmente se consideran dos aproximaciones al problema de la identificación y cuantificación de especies en alimentos: detección de proteínas específicas y detección de secuencias de DNA específicas de especie. Las ventajas de las técnicas basadas en DNA han hecho que gran parte del desarrollo actual de sistemas de detección e identificación se base en ésta molécula. Una de las opciones más versátiles es la utilización de sistemas de reacción de polimerasa en cadena en tiempo real, porque permite tanto la detección como la cuantificación del DNA en una muestra compleja. A su vez, existen varias metodologías para la realización de la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real entre los que se encuentran los sistemas basados en sondas fluorescentes específicas y los basados en moléculas fluorescentes de unión inespecífica a DNA (SYBR[®] Green). Desde hace varios años se viene utilizando una variante de las sondas fluorescentes de hidrólisis con mayor afinidad por el surco menor del DNA (MGB) para determinaciones de polimorfismos en biomedicina. Estas sondas pueden ser útiles también para el análisis de especies en alimentos ya que permitirían amplificar DNA muy fragmentado en alimentos procesados, y detectar variantes mediante análisis de polimorfismos de un único nucleótido, entre especies filogenéticamente próximas y entre variedades dentro de una misma especie. Con estas premisas se han plantado los siguientes objetivos:

- 1- Desarrollar y determinar los límites operacionales de un método basado en la tecnología de la reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real con sondas TaqMan[®] MGB específicas de grupos taxonómicos amplios (aves y mamíferos) combinadas con cebadores específicos de especie cuya diana es una secuencia mitocondrial para identificación y cuantificación de especies.

- 2- Evaluar el sistema utilizando DNA de diferentes matrices: mezclas de DNA de dos y cuatro especies de músculo fresco, mezclas de tejido de dos especies frescas, y procesadas por procedimientos de envasado y desecado, así como mezclas comerciales procesadas.

3- Estudiar el efecto que tiene la degradación de las muestra en la cuantificación del método mediante la relación de amplificación de amplicones de distintos tamaños con objeto de validar los datos obtenidos de los análisis cuantitativos.

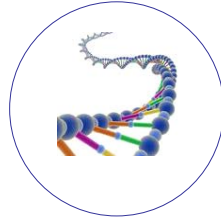
4- Evaluar el uso de materiales de referencia adaptados a la matriz en alimentos para aumentar la calidad de los datos cualitativos y cuantitativos derivados de los métodos de PCR en tiempo real

5- Comparar los límites operacionales del sistema propuesto con sondas TaqMan[®] MGB específicas con otros métodos disponibles, en concreto con la utilización de moléculas fluorescentes de unión inespecífica a DNA (SYBR[®] Green) y valorar las ventajas y posibles aplicaciones de unos y otros.

6- Evaluar la aplicación de la tecnología TaqMan[®] MGB para la detección y cuantificación de DNA en alimentos de especies filogenéticamente próximas.



4. Trabajos experimentales



Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time PCR.

María López-Andreo^a, Laura Lugo^a, Amando Garrido-Pertierra^a, M. Isabel Prieto^b and Antonio Puyet^{a,*}.

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

^b Servicio de Biotecnología, Centro Nacional de la Alimentación, Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

* Correspondence to:

Antonio Puyet

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

Av. Puerta de Hierro s/n

28040 Madrid, Spain.

Tel: +34 913943827

Fax: +34 913943824

Email: apuyet@vet.ucm.es

Publicado en: *Analytical Biochemistry* **339** (2005) 73-82.

ABSTRACT:

Six TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) systems using minor-groove binding (MGB) probes have been developed for the detection and quantitation of bovine, porcine, lamb, chicken, turkey and ostrich DNA in complex samples. Species-specific amplification was achieved by combining only two fluorogenic probes and ten oligonucleotide primers targeting mitochondrial sequences, decreasing significantly the cost of the assay. The limits of detection ranged from 0.03 to 0.8 pg of template DNA. Analysis of experimental mixtures containing 2-4 different species showed the suitability of the assay for detection of >1% of pork, chicken or turkey and >5% of cattle or lamb. The quantitation accuracy in samples containing 10 to 100% of beef or pork DNA was close to 90%. The system is complemented with one additional TaqMan[®]-MGB detector, based on consensus sequence segments of the nuclear 18S rRNA gene. A method to evaluate the presence of unknown eukaryotic DNA in a mixture is presented, in which data derived from the species-specific detection is compared to the experimental values obtained with the general 18S detector. This method allows the validation of the quantitative measurements providing an internal control of the total content of PCR amplifiable DNA in the sample. The system was tested on DNA mixtures containing different shares of up to four different species, and on DNA extracted from processed commercial food samples.

Keywords: Real-time PCR/Species identification/DNA quantitation/cytochrome b/18S rRNA.

INTRODUCTION

Several techniques are currently used for the unequivocal identification of materials from different biological origin in complex mixtures. These methods are particularly relevant in forensic applications, and in the human and livestock food industry. The health risks associated to potentially unsafe food and feedstock formulations, together with the increasing demand of information on the origin and composition of processed food products has propelled the development of more accurate and powerful analysis methods. DNA-based methods have been shown to be particularly powerful in the analysis of processed foods or forensic samples, as DNA is less liable to be disrupted than many proteins, the identification is not dependent on the tissue, and sequence data can be analyzed at different levels of specificity, covering from groups or species to even variants or genetically modified individuals (reviewed in [1]). Species-specific primers, alone or in combination with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), and Random Amplified Polymorphic (RAPD) DNA technologies, have been designed for the identification of a large number of

commercial mammals, birds, fish and mollusks using mitochondrial DNA [2-5], ribosomal RNA (rRNA) [6,7] or nuclear genes [8,9]. Methods based on PCR amplification with species-specific primers are relatively fast, but accurate identification often requires either nuclease restriction analysis or sequencing of the reaction product. Methods based on RFLP or RAPD can be used for the screening of a broader range of species, but usually require the integrity of the DNA template and are more difficult to standardize for processed-food samples.

The application of fluorogenic probes in combination with PCR, commonly used in real-time PCR protocols, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis and pathogen diagnostic tools, has been less investigated for the development of food authentication methods. With this approach, the positive identification (emission of fluorescence) requires the effective binding of a specific probe in addition to the binding of the PCR primers, increasing the reaction specificity, which usually does not require any further analysis. In addition, fluorescence data can be collected directly from a real-time PCR instrument or a fluorescence spectrophotometer, avoiding the need for electrophoresis and allowing the selection of short sequences for amplification, which may be critical when obtaining DNA from processed-food or highly deteriorated forensic samples.

TaqMan[®] probes are designed as short oligonucleotides bound to both a fluorescent dye and a quencher [10]. As the probe matches an internal sequence of the PCR amplicon, it is hydrolyzed by the 5'-nuclease activity of the Taq polymerase at every cycle, releasing the fluorescent dye from the quencher. Standard protocols using fluorogenic TaqMan[®] probes in PCR require that the melting temperature (T_m) of the probe should be 10 °C above the T_m of the primers. The binding of a typical 27 nucleotide probe to a target sequence with one mismatch located in the middle third of the probe may require the decrease of the annealing temperature in 7 to 10 °C, reducing altogether the specificity of the amplification primers. This may hamper the use of this kind of probes for the discrimination of species groups, as it may be difficult to find a DNA region fulfilling the requirements of a group-conserved sequence in both probe and primer sequences adequately spaced. Minor-groove binder-oligodeoxynucleotide (MGB) conjugates [11] show increased affinity for the target sequence, allowing shorter (13 to 16 mer) nucleotides to be used as probes, broadening the variety of sequences suitable for species or group-specific targeting. The use of selective primers based on mismatches at its 3'-end, highly refractory to amplification [12] has been reported to be useful for the discrimination of closely related species [9]. In this work, we use fluorogenic MGB probes designed to target inter-species specific sequences in combination with oligonucleotide primers showing species-specific mismatches at its terminal 3' nucleotide to develop a method which uses only two labeled probes, and different combinations of 10 oligonucleotide primers for the identification of beef, lamb, pork, chicken, ostrich and turkey material in food samples.

The possibility of performing quantitative measurements is one of the main potential advantages of using real-time PCR technology is. This capacity has been thoroughly exploited in gene expression studies. Reliable quantitative measurements require the use of an external control to normalize the results. In gene expression applications, this is usually achieved by measuring the mRNA content of a housekeeping gene. Quantitation of DNA from different species in food products can be improved by using an external control PCR reaction to have a measurement of the total amplifiable DNA present in the sample, and normalize the results obtained with the specific probes. While identification procedures usually rely on the amplification of multicopy target sequences (mitochondrial DNA, rRNA genes and DNA repeated motifs), obtaining comparable quantitative measurements from different species, would require that both the specific and the non-specific probes should target single-copy genes. However, the sensitivity of the reaction may be severely decreased. In an effort to make the use of multicopy sequences compatible with quantitative measurements, we have evaluated here the possibility of using a method of quantitation based on a mitochondrial sequence as species-specific target, while an eukaryotic nuclear 18S RNA sequence is used as an indicator of the total DNA in the reaction.

MATERIALS AND METHODS

DNA extraction

Meat and prepared food samples were obtained from commercial sources. DNA species of the control samples were confirmed by sequencing the *cytB* gene and its comparison with published sequences at NCBI Genbank. DNA was obtained from either 1 g of raw material using either a standard SDS/Phenol extraction protocol [13] or from 35 mg by using the NucPrep protocol on the 6100 Nucleic Acid PrepStation from Applied Biosystems. Before extraction, muscle samples were either chopped very finely or ground to a fine powder in a hand-held macerator having first been freeze-dried. DNA was quantified after staining with Picogreen dsDNA quantitation reagent (Molecular Probes), using a Perkin-Elmer LS-50B fluorescence spectrophotometer and comparing the fluorescence with that from DNA standards of known concentration.

DNA sequences and alignments

DNA sequence alignments were performed using ClustalX program [14]. Sequences were obtained from the NCBI Genbank: *Bos taurus*: NC_001567; *Ovis aries*: NC_001941; *Sus scrofa*: NC_000845; *Gallus gallus*: NC_001323; and *Struthio camellus*: Y12025. The sequence of the *ND5 – cytB* region in turkey was determined from commercial samples using primer pairs encompassing those regions for PCR amplification. The PCR products

obtained were further purified by filtration through Chroma-spin-100 columns (Clontech), and both strands of the amplified fragments were sequenced either directly using the same oligonucleotides as primers or after subcloning into a pGEM-T vector (Promega), using Applied Biosystems sequencing kits and 3730 Automatic Sequencer.

Primer and probe design

Primers and probes were designed with the help of the Primer Express software from Applied Biosystems. The sequence and properties of the oligonucleotides used are shown in Table 1. The species-specific identification primer and probe sets (detectors) were devised to minimize the use of specific fluorescent probes. Thus, the three mammal species share the probe S1FAM, while the avian species use S7FAM. The primers and the probes were selected after alignment of the mitochondrial DNA encompassing the 3' end of ND6 (ND5 for birds) and the 5' end of *cytB*. The DNA alignments of these regions and the location of primers and probes are shown in the figure 1. Specific amplification is obtained by using the primer pairs FCSUS1/RSUS2 (pork), FBOS3/RBOS1 (cattle), FC1/ROVIS2 (lamb), FA1/RA1 (Chicken), FA2/RA1 (Ostrich) and FA5/RA1 (turkey). After alignment of the complete 18S rRNA gene from 50 selected eukaryotic organisms, incorporating mammals, birds, reptiles, amphibians, arthropods, molluscs, green plants and fungi, three conserved regions were selected to design the EUKF/EUKR pair of primers and the probe S5FAM for the quantitation of the total eukaryotic DNA in the sample.

Real-time PCR analysis

DNA detection was performed by amplification using the real-time sequence-detection system 7000 from Applied Biosystems. Reactions were carried out by duplicate in 96-well plates. The 25 μ L reaction mixtures contained 12.5 μ L of Taqman master mix (which includes the heat-activated AmpliTaq GoldTM enzyme), 300 nM of each specific oligonucleotide primer, MGB probe 200 nM, and 2 μ L of different dilutions of the DNA mixture, corresponding to 0.006 pg to 100 ng of total DNA. The reaction conditions were: 10 min at 95°C for enzyme activation and 50 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 55°C. Readings were taken every cycle and the logarithm of the increment in fluorescence was plotted versus the cycle number. The threshold level was fixed at the same mid-exponential position for all runs. The detectors (combination of primers and probe for a given reaction) and the species identified are shown in table 2.

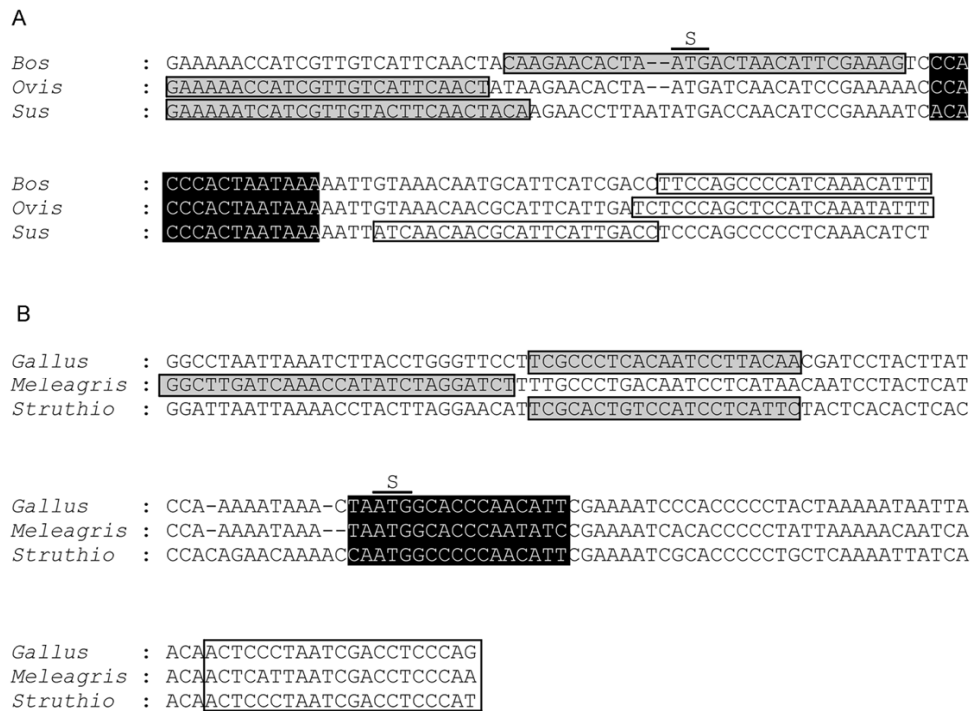


Figure 1. Alignment of the 5' *cytB* region of (A) *Bos taurus*, *Ovis aries* and *Sus scrofa*, and (B) *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo* and *Struthio camellus*. The position of the target sequences for the forward primers, TaqMan® MGB probes and reverse primers are indicated as shadowed, black and empty boxes respectively. S: position of the *cytB* start codon.

Data analysis

The mean value and standard deviation from three independent experiments, each performed with duplicate reactions, were used to build the standard curves and to extrapolate unknown DNA samples. The errors associated to parameters calculated from other variables, such as N, C^{c.th} and percentages were calculated by using the general expression:

$$\Delta M = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial M}{\partial X_i} \right)^2} (\Delta X_i)^2$$

where ΔM is the error associated to the M magnitude, which is calculated using the variables X_1, X_2, \dots, X_n with associated errors $\Delta X_1, \Delta X_2, \dots, \Delta X_n$ respectively. Percentage errors were calculated as 100 times the difference between the true and the experimental values divided by the true value.

Table 1. Oligonucleotide primers and probes

Oligonucleotide Sequence (5'→3')		Target
Forward primers		
FBOS3	CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG	Bovine mitochondrial <i>t-Glu</i> gene
FC1SUS	GAAAAATCATCGTTGTACTIONTCAACTACA	Porcine mitochondrial <i>t-Glu</i> gene
FC1	GAAAAACCATCGTTGTCATTCAACT	Sheep mitochondrial <i>t-glu</i> gene
FA1	TCGCCCTCACAATCCTTACAA	Chicken <i>ND5</i> gene
FA2	TCGCACTGTCCATCCTCATT	Ostrich <i>ND5</i> gene
FA5	GGCTTGATCAAACCATATCTAGGATCT	Turkey <i>ND5</i> gene
EUKF	AGCCTGCGGCTTAATTTGAC	Consensus eukaryotic <i>18S</i> RNA gene
Reverse primers		
RBOS1	AAATGTTTGATGGGGCTGGA	Bovine <i>cytB</i>
RSUS2	GGTCAATGAATGCGTTGTIGAT	Porcine <i>cytB</i>
ROVIS2	AAATATTTGATGGAGCTGGGAGA	Sheep <i>cytB</i>
RA1	CTGGGAGGTCGATTAGGGAGT	Consensus Chicken, turkey and ostrich <i>cytB</i>
EUKR	CAACTAAGAACGGCCATGCA	Consensus eukaryotic <i>18S</i> RNA gene
MGB Probes		
S1	CCACCCACTAATAAA	Consensus bovine, ovine, porcine (1 mismatch) <i>cytB</i>
S7	TAATGGCACCCAACATT	Consensus chicken, turkey and ostrich <i>cytB</i> (1 mismatch)
S5	AGGATTGACAGATTGAG	Consensus eukaryotic <i>18S</i> RNA gene

Table 2. Detectors as combinations of primers and TaqMan® MGB™ probes in real-time PCR.

Detector	Primers	Probe	Amplicon (bp)	Species
BOS	FBOS3/RBOS1	S1	92	Cattle
SUS	FC1SUS/RSUS2	S1	100	Pork
OVS	FC1/ROVIS2	S1	119	Sheep
GAL	FA1/RA1	S7	117	Chicken
MEL	FA5/RA1	S7	146	Turkey
STR	FA2/RA1	S7	120	Ostrich
18S	EUKF/EUKR	S5	120	Eukaryota

RESULTS

Efficiency, specificity and detection limit of the PCR relations

In real-time PCR analysis, the threshold cycle C_T indicates the fractional cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold:

$$N_c = N \times E^{C_T} \quad (1)$$

where E is the PCR efficiency, N is the initial amount of DNA and N_c is the amount of DNA at the C_T cycle. Comparison of real-time PCR data obtained from different primer pairs and probes are fully comparable only when the experimental efficiencies for the different reactions are similar and approach the theoretical optimum of 2 (one doubling in the number of copies of the target DNA per PCR cycle). The PCR amplification efficiency for each detector (primer pair and probe combination), E , can then be calculated from the expression derived from 1 [15]:

$$C_T = -(1/\log E)\log N + b \quad (2)$$

where the intercept $b = \log N_c / \log E$. Therefore, a plot of C_T vs. $\log N$ yields a line in which the slope equals $-1/\log E$. The efficiencies of the BOS, SUS, OVS, GAL, MEL, STR and 18S detectors, were calculated from C_T vs. $\log N$ plots using five-fold serial dilutions of 100 ng of purified DNA from each species. The efficiencies, $E = 1.9 \pm 0.1$, approached the optimal of one duplication in the number of copies per cycle. All the subsequent calculations were done by duplicate using both the actual E value for each detector and the approximate value of $E=2$; however, as results were not significantly different, only the values calculated using $E=2$ are shown. Linearity of the C_T vs. $\log N$ plots was lost for some detectors around cycle 40 of the PCR (not shown). This indicates that, under our experimental conditions, C_T values above 40 may not be reliable for identification and quantitation purposes and, therefore, were not considered in the following calculations. The detection limits, calculated from the specific-detectors standard curves as the DNA amount yielding $C_T=40$ were: 0.03 pg (cattle), 0.07 pg (pork), 0.07 pg (lamb), 0.006 pg (chicken), 0.8 pg (turkey) and 0.03 pg (ostrich).

The specificity of the detectors was tested by running real-time PCR reactions with DNA from different species. While no background cross-reaction was detected electrophoretically (not shown), some residual fluorescent signal could be detected in real-time PCR experiments using saturating amounts (>60 ng) of non-target DNA. To obtain a measurement of the signal to noise ratio R when the specific detectors are used for identification, we used the expression derived from equation (1):

$$R = E^{C^s - C^{s,x}} \quad (3)$$

where C^s is the C_T obtained with the target species DNA, and $C^{s,x}$ is the C_T obtained from a reaction containing the same amount of non-target DNA. As shown in table 3, the signal to noise ratios for 100 ng of template DNA ranged from 10^{-5} to 10^{-7} . Due to this cross-species amplification, the limits for reliable detection of cattle and chicken DNA in mixed samples should be restricted to 0.06 pg and 0.09 pg respectively.

Table 3. Ratio of target to non-target DNA amplification detected by real-time PCR using species-specific detectors.

Detector	Template DNA					
	Cattle	Pork	Lamb	Chicken	Turkey	Ostrich
BOS	1 ^(a)	6×10^{-5}	1×10^{-6}	4×10^{-7}	6×10^{-6}	5×10^{-7}
SUS	7×10^{-5}	1	7×10^{-5}	2×10^{-6}	4×10^{-7}	4×10^{-6}
OVS	5×10^{-6}	1×10^{-5}	1	3×10^{-6}	2×10^{-7}	1×10^{-5}
GAL	1×10^{-5}	9×10^{-6}	6×10^{-5}	1	4×10^{-5}	3×10^{-5}
MEL	2×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-5}	1	2×10^{-5}
STR	1×10^{-6}	7×10^{-7}	9×10^{-7}	1×10^{-5}	7×10^{-5}	1

(a) Reactions contained 100 ng of DNA as template. R values were calculated using equation (3).

DNA quantitation on two-species sample tests

As shown in Figure 2, identical amounts of template DNA from different species yield different C_T for both mitochondrial and nuclear 18S genes. These variations in the C_T values are likely caused by inter-species differences in the number of copies of the target *cytB* and 18S rRNA genes. Such differences may cause a bias in quantitative measurements when the 18S consensus detector is taken as a measure of the total DNA in the sample and, consequently, would not allow the normalization of quantitative results by simply finding the ratio mitochondrial/18S DNA for any given species in a mixed sample. To overcome this difficulty, but keeping the advantage of the extended sensitivity and sequence conservation of the RNA18S detector, we propose the following protocol, which allows the detection of known and unknown DNA species in the sample and, secondly, the quantitation of the known species. Firstly, samples containing mixed species DNA are analyzed both using the specific mitochondrial detectors and the generic 18S detector. Species-specific and 18S control reactions are run in parallel with known amounts of the purified target DNA for each species analyzed, and standard plots are drawn for each detector/species pair. The C_T obtained with each specific detector on the problem sample (C^s) is extrapolated to the standard curve, yielding the amount N of every species DNA in the sample. Secondly, the C_T obtained using the consensus 18S detector (C^c) provides an indication of the total eukaryotic

DNA suitable for PCR amplification in the sample. Thus, in samples containing only one species, the experimental C^c should match the cycle obtained from the 18S standard curve for that species ($C^{c,th} = -3.3 \log N + b^c$), using N as the DNA amount calculated with the specific detector. An experimental C^c significantly shorter than the calculated $C^{c,th}$ value would be an indication of the presence of DNA from other eukaryotic species. In samples containing two or more known species, the experimental C^c should reflect the sum of the 18S target sequences added by each species. The relative amounts for each DNA obtained with the specific detector can be used to define a theoretical curve for the mix of 18S target sequences. The theoretical line would be positioned between those produced by the species with the lowest and highest RNA18S gene number of copies. For a mix containing X, Y and Z species, in which real-time PCR yields N_X , N_Y and N_Z DNA amounts with the specific detectors, let Y be the species with the highest RNA18S copy number (lowest C^c registered for a given DNA amount). Then the theoretical standard curve for the 18S detector may be described by the equation:

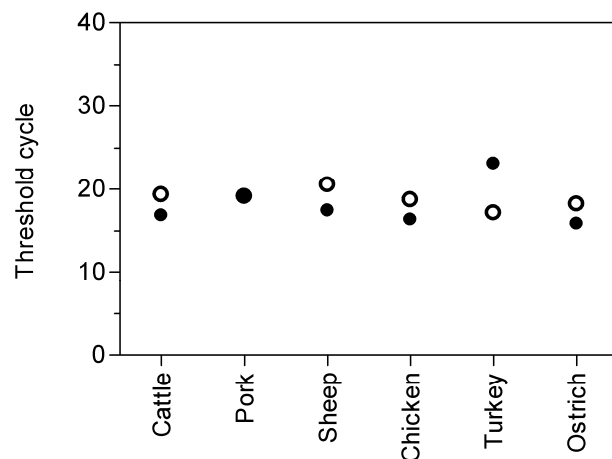
$$C^{c,th} = -3.3 \log(N_T) + b_T \quad (4)$$

where $N_T = N_X + N_Y + N_Z$, and the intercept b_T is calculated by:

$$b_T = b_Y^c + \frac{N_X}{N_T} (b_X^c - b_Y^c) + \frac{N_Z}{N_T} (b_Z^c - b_Y^c) \quad (5)$$

where b_X^c , b_Y^c and b_Z^c are the b values obtained from the standard 18S curves for X, Y and Z species respectively. Therefore, comparing the experimental C^c obtained for the mixed sample, and the theoretical $C^{c,th}$ calculated from equation (4) it is possible to ascertain if the total copy number of RNA18S target sequences matches the sum of the contributions of each DNA species. Should this be the case, then N_X/N_T would correspond to the actual ratio of the species DNA to the total eukaryotic DNA content in the sample. Conversely, samples containing DNA from non-identified species may be detected as those showing $C^c < C^{c,th}$. In this last case N_T would underestimate the total DNA content of the sample, and N_X/N_T may therefore be used to find the share among the species identified, but not the fraction on the total DNA.

Figure 2. Variability of the copy number of mitochondrial and 18S rRNA sequences among species. Threshold cycles were obtained from real-time PCR reactions using either the mitochondrial species-specific detector (●) or the 18S detector (○) on equal amounts of template DNA from six different species. Reactions contained 2 μ L of total DNA, extracted from muscle, at 30 ng μ L⁻¹. Values are the average of three replicates, standard deviation < 0.12.



To test the feasibility and accuracy of this method of calculation, four series of reactions were prepared by mixing different amounts of beef+pork, chicken+turkey, beef+lamb or beef+ostrich DNA. The mixed-DNA samples were used as template for real-time PCR reactions using the BOS, SUS, OVS, GAL, MEL, STR and 18S detectors. Single-species control reactions were processed separately using 100 ng of purified DNA from each species. An example of the results obtained for the beef/pork mixtures are shown in the table 4. As expected, the calculated $C^{c.th}$ values replicate accurately the experimental C^c obtained with the 18S detector on the mixed samples. This indicates that no additional eukaryotic DNA, besides cattle and pork, is detected in the sample and, therefore, the N_{Bos} and N_{Sus} values calculated using the BOS and SUS detectors can be used to obtain the percentage of these two DNA species. Similar results were obtained with the chicken/turkey, cattle/lamb and cattle/ostrich mixtures (data not shown).

Table 4. Quantitation of cattle, pork and total eukaryotic DNA in sample test reactions.

DNA (ng)		C_T			N_{Bos} (ng) ^(a)	N_{Sus} (ng) ^(a)	$C^{c.th}$ ^(b)	$C^{c.th}/C^c$
Cattle	Pork	C_{Bos}^s	C_{Sus}^s	C^c				
100	0	16.8	31.5	19.3	100±12	0.018±0.002	N/A ^(c)	N/A
99.9	0.1	16.9	29.7	19.5	88±10	0.064±0.008	19.5	1.0
99	1	16.8	26.2	19.4	100±12	0.73±0.08	19.3	0.9
75	25	17.0	21.0	19.3	87±10	27±3	19.1	0.9
50	50	17.5	20.1	19.3	61±7	50±6	19.1	0.9
25	75	19.1	19.6	19.2	20±2	71±8	19.3	1.0
1	99	25.0	19.2	19.2	0.34±0.04	93±11	19.2	1.0
0.1	99.9	29.2	19.3	19.3	0.018±0.002	87±10	19.3	1.0
0	100	30.7	19.1	19.1	<0.01	100±12	N/A	N/A

(a) Values calculated for C^s using the specific detectors standard curves.

(b) $C^{c.th}$ calculated using equation (4). The b_{Sus}^c and b_{Bos}^c values were calculated from the samples containing 100 ng of pure DNA: $b_{Sus}^c = 19.1 + 3.31\log 100$ and $b_{Bos}^c = 19.3 + 3.31\log 100$. As $b_{Sus}^c < b_{Bos}^c$ then $b_T = b_{Sus}^c + \frac{N_{Bos}}{N_T} (b_{Bos}^c - b_{Sus}^c)$, and $C^{c.th} = -3.31\log(N_{Bos} + N_{Sus}) + b_T$. Error associated to all $C^{c.th}$ measurements was < 5%

(c) N/A: not applicable

The experimental percentages calculated from the N values obtained for these admixtures are shown in table 5. Even considering the relative high dispersion (approximately 10%), due to the multiplicative effect of the standard deviations of C_T to the final experimental error associated to the DNA amounts and percentages, the calculated values fitted the actual percentages of the species in the mix. The assays detected the

presence of DNA down to 1% of the total, although accurate quantitation was lost at this level. As the accuracy of the method appear to be dependent on DNA percentages in the samples, new measurements were performed on mixed samples containing small amounts of pork and beef, and the percentage error (indicating the difference between the actual and calculated DNA amounts) was calculated for every sample. The results, shown in figure 3, indicate that the relative errors were approximately constant (below 10%) for samples containing >10% of either pork or beef DNA. At 5% DNA the error increases to 20%, and further up as the percentage in the mix is reduced to 1%.

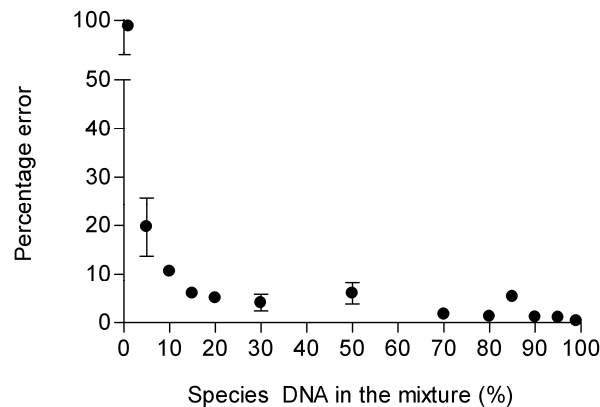


Figure 3. Accuracy of the quantitative data collected using BOS and SUS detectors on different DNA admixtures. The relative error for each DNA-mix provides a measure of the difference between the actual DNA content and the value obtained from real-time PCR assays using BOS and SUS detectors. Each point represents the mean of two duplicated experiments: one using beef and one using pork at the indicated shares. Data shown as mean percentage error (relative error x 100) \pm 1 standard deviation.

The comparison of C^c and $C^{c,th}$ provides a measure of the eukaryotic DNA not identified with the specific detectors. This can be visualized by calculating the expected $C^{c,th}$ of a DNA mixture in which one or more species remain unidentified, and comparing it to the experimental C^c . The figure 4 illustrates this comparison: different mixtures of cattle and pork DNA were analyzed using 18S and BOS, but not SUS, detectors. Only the amount of cattle DNA could then be calculated and, using this value, the expected $C^{c,th}$ was obtained. The C^c and $C^{c,th}$ curves diverge as the ratio cattle/total DNA is reduced. At cattle/total DNA ratios approaching one, the detection of unidentified DNA becomes uncertain due to the inherent variability of the C^c and $C^{c,th}$ values. The limit for experimental detection of unidentified DNA by the $C^{c,th}/C^c$ method was calculated using the linear regression fitted curves of the data

shown in figure 4: $y = m^c \log \frac{N_{Bos}}{N_T} + b^c$; and $y = m^{c,th} \log \frac{N_{Bos}}{N_T} + b^{c,th}$. Such limit

would be the intercept between the two less-favorable curves from the family generated by

the errors (Δ associated to m and b). Thus, for the cattle/pork-DNA mixture in the example of figure 4, $b^{c,th}$, b^c , $m^{c,th}$ and m^c were, respectively, 24.13, 18.09, -2.85 and 0.15, and $\delta b^{c,th}$, δb^c , $\delta m^{c,th}$ and δm^c were, respectively, 0.09, 0.07, 0.06 and 0.04. The $C^{c,th}$ and C^c values are, therefore, expected to be significantly different when the percentage of pork DNA in the mixture exceeds 20%.

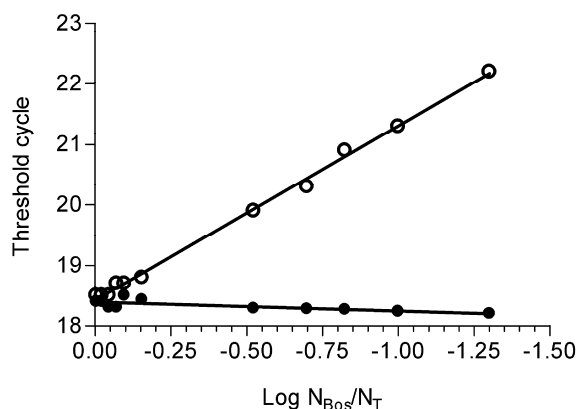


Figure 4. Divergence of the threshold cycle obtained experimentally by using the 18S detector C_c (●) on samples of mixed DNA containing different shares of cattle and pork, and the theoretical $C_{c,th}$ (○), calculated from the N_{Bos} values obtained using the species-specific BOS detector. The calculation of $C^{c,th}$ in this example assumes that only cattle DNA is present in the sample.

DNA quantitation in complex mixtures and processed food products

To further test the usefulness of the method in mixtures containing more than two species, complex samples containing DNA from four different species were tested for detection and quantitation. The results, shown in table 6, indicate a good agreement of the amounts detected and the real content of each species. As observed for two-species DNA mixtures, the quantitation of cattle DNA at low percentages appeared to be underestimated. The $C^{c,th}/C^c$ obtained for mix 1 and 2 were 1.00 and 0.99 respectively, validating that all eukaryotic DNA in the sample was detected and identified.

Finally, DNA was extracted from different commercial food products and tested with the six specific detectors (table 7). As shown, the results matched reasonably well the species content declared in the labels. Two samples, the beef+pork hamburger and the sausage B, yielded $C^{c,th} \leq C^c$, indicating that no extra eukaryotic DNA is detected. In contrast, sausages A, C and D yielded $C^{c,th} > C^c$, suggesting that other species, different from cattle, pork, lamb, chicken, turkey and ostrich, may represent more than 20% of the total DNA in the sample. As the addition of vegetable protein and starch was also indicated in the labels of these products, it is likely that the unidentified DNA in these samples had a plant material origin

Table 5. Species quantitation on two-species DNA mixed samples.

DNA content (%)	DNA detected (%) ^a							
	Cattle / Pork		Chicken / Turkey		Cattle / Lamb		Cattle / Ostrich	
99.9 / 0.1	100 ± 10	0.075 ± 0.007	100 ± 11	0.109 ± 0.005	100 ± 12	0.0051 ^b	100 ± 9	0.079 ± 0.007
99 / 1	99 ± 11	0.78 ± 0.08	99 ± 12	1.10 ± 0.13	99 ± 9	0.63 ± 0.06	98 ± 12	1.6 ± 0.2
75 / 25	77 ± 8	22 ± 3	76 ± 10	23 ± 3	78 ± 7	22 ± 2	63 ± 9	36 ± 5
50 / 50	55 ± 5	45 ± 6	52 ± 5	47 ± 5	57 ± 5	43 ± 4	43 ± 6	57 ± 8
25 / 75	25 ± 2	75 ± 8	31 ± 3	68 ± 6	34 ± 2	66 ± 4	35 ± 5	65 ± 10
1 / 99	0.31 ± 0.03	100 ± 13	1.60 ± 0.13	98 ± 8	1.63 ± 0.08	98 ± 10	0.29 ± 0.03	100 ± 9
0.1 / 99.9	0.020 ± 0.002	100 ± 11	0.070 ± 0.005	100 ± 7	0.0012 ^b	100 ± 12	0.008 ± 0.008	100 ± 10

^a Percentages calculated from N values as shown in table 4.

^b Errors below 0.001 are omitted.

Table 6. Quantitation of four species mix-DNA samples using specific detectors

Contents	Mix A (%)		Mix B (%)	
	Real	Detected	Real	Detected
Pork	40	41±3	20	28±3
Lamb	32	29±3	44	39±3
Chicken	20	25±2	32	32±3
Cattle	8	4.8±0.6	4	1.4±0.2

Table 7. Species DNA identification and quantitation in commercial meat food samples.

Sample	Species content (label)	Detector ^a									
		BOS		SUS		GAL		MEL		18S	
		C ^s	ng (%) ^(b)	C ^s	ng (%)	C ^s	ng (%)	C ^s	ng (%)	C ^c	C ^{c,th}
Hamburger	Beef + Pork	17.5	52(61)	20.9	33(39)	42.1	ND	40.0	ND	20.0	18.7
Sausage A	Chicken + Pork	31.1	ND ^c	18.5	19(80)	20.5	4.8(20)	26.6	0.07(0)	18.1	20.4
Sausage B	Chicken 80%	33.8	ND	23.5	0.8(2)	16.9	75.8(98)	24.9	0.3(0)	24.1	18.8
Sausage C	Pork 47% + Poultry 24%	30.4	ND	20.1	50(58)	17.1	035.6(42)	31.8	ND	17.7	18.3
Sausage D	Pork 67.7% + Turkey 17.7%	28.3	ND	18.6	145(89)	26.7	0.1(0)	22.8	17.5(11)	16.5	17.2

^a OVS and STR detectors were also tested yielding undetectable levels of lamb and ostrich in the samples.

^b Percentages based on experimentally identified species DNA only.

^c ND: not detected (< 0.0007 ng) .

DISCUSSION

In spite of the increasing use of real-time PCR technology for the quantitation of gene expression and identification of pathogens, there are relatively few reports on its application for identification and quantitation of species in complex DNA samples. Some of the drawbacks found are inherent to any procedure based on DNA, as DNA yields may depend on the source material, method of extraction, or the fragmentation of DNA which takes place in highly processed food. The comparison of results obtained from independent analysis usually requires normalization of the quantitative results to a reference standard. In gene expression applications, the mRNA of a reference gene is used to standardize the transcription level of the target gene. Quantitation of a transgenic DNA in a transgenic/non-transgenic mix is feasible using a common species-specific sequence for standardization and control of the PCR reaction [16]. When several species, even of unknown origin, are present in the sample, ascertaining the relative amounts of each species in the mix may require an unique reference target sequence identical in all the possible species. In addition, all species should preferably harbor the same number of copies of this sequence per cell. Furthermore, the copy number of the species-specific and reference sequences should be as high as possible to increase the sensitivity of the method. The high cost derived from the use of specific fluorescent probes for each species analyzed may also hinder the introduction of these methods. The cost per reaction can be reduced using SYBR[®] Green as fluorescent dye instead of oligonucleotide probes [17-19] however, some specificity of the reaction can be lost, as false positives may appear due to unspecific amplification, making recommendable to visualize the amplification bands electrophoretically after the PCR run. A few methods using specific fluorescent probes in real-time PCR have been recently proposed which make use of single-copy nuclear gene targets for species identification only [20], or multicopy 12S ribosomal DNA [21] for identification and quantitation. In contrast to the above indicated methods, the strategy presented here makes use of a combination of primers and TaqMan[®] MGB probes in which several species share the same probe, reducing significantly the cost per reaction. MGB oligonucleotides facilitate the design of probes targeting short consensus DNA segments. In this work we tested the performance of a method using the smallest number of elements in a modular fashion, which may easily allow the addition of more species, just by finding a few specific nucleotide positions close to the probe target sequence. In our system, species-specificity relies basically on the primers sequence, while TaqMan[®] MGB probes ensure the amplicon genuineness, reducing the uncertainty due to the appearance of background signals. It should also outperform SYBR[®] Green-based methods because it validates the amplification signal without the need of electrophoresis. We have tested this strategy with three mammal and three bird species, obtaining good species-specificity, even when saturating amounts of the non-specific DNA are used as template. Considering the reaction efficiencies and the background cross-amplification for each detector, the minimal amount of detectable template DNA by our method is even lower than those reported for other real-time PCR based methods [18, 21].

The comparison of the experimental data to the actual contents of the test samples shows that both the absolute DNA amount and the relative content of each species DNA can be effectively measured. The deviation of the experimental values to the actual DNA amounts appear to be higher than those reported for other methods of quantitation, such as transgene contents in maize grains [16]. This is no unexpected, as quantitation of DNA from genetically modified organisms is achieved by dividing the number of copies of the transgene into the total copies of DNA, which is obtained from the amplification of an endogenous gene, such as zein in maize. As both the transgene and control genes share the same genomic source, its amplification would not be affected by distortions derived from the combination of different species DNA. In contrast, the difficulty to obtain accurate measurements of multi-species DNA templates is illustrated by the ample variability of results reported by several laboratories [19, 21]. Our method shows good resolution for DNA amounts exceeding 10% of the total. DNA shares in the range of 5-10% can be still quantified with an accuracy of 80%. At percentages below 5%, the species can be detected but not effectively quantified. Still, the detection method may help to differentiate between technically unavoidable contamination and intentional admixture.

Multi-species specific probes have been used previously to standardize quantitative measurements. Quantitation of mule duck in goose foie-gras has been reported using a common duck-goose detector as calibrator [21]. Otherwise, conserved sequences have been used for detection of species belonging to a taxonomic group, as described for ruminants [18], aves [19] or mammals [22]. In the application described in this work, the use of a conserved region in the ribosomal 18S sequence serves three purposes: *i.* provides a positive control on the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample; *ii.* traces the presence of DNA which has not been detected by the species-specific detectors, and *iii.* validates the quantitation of different species-DNA, allowing the calculation of the percentages in the mixed sample. This is particularly useful for the authentication of food and feed labeling, where only the percent of the main components are usually indicated. The method presented here overcomes the drawback of the variability in the number of copies of the ribosomal RNA genes among species, by fitting the experimental results to a theoretical 18S standard curve calculated from the data obtained for each species analyzed. In addition, the comparable gene dosage of the specific and common sequences, indicated by similar C_T values, reduces the error associated to calculated parameters dependent on these experimental values.

Unidentified DNA can also be detected indirectly by finding the $C^{c.th}/C^c$ ratio, which can be calculated experimentally using the $C^{c.th}$ and C^c standard curves for each species-specific/18S detector pair. This capability is restricted to the detection of unidentified DNA contents higher than 20% of the total eukaryotic DNA in the sample, which would produce significant differences between $C^{c.th}$ and C^c .

By selection of adequate control test samples and other species-specific detectors, this approach can be extended for analysis of other species, helping evaluate the quality of processed products containing complex mixtures of biological materials.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical help of I. Ballesteros is acknowledged. Research supported by grant AGL2001-1423 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain.

REFERENCES

- [1] Lockley AK & Bardsley RG (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci Technol* **11**, 67-77.
- [2] Matsunaga I, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J & Shimura Y (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* **51**, 143-148.
- [3] Sebastio P, Zanelli P & Neri TM (2001) Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their mitochondrial cytochrome b gene, and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves. *J Agric Food Chem* **49**, 1194-1199.
- [4] Lockley AK & Bardsley RG (2000) Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *J. Agric. Food Chem* **48**, 4463-4468.
- [5] Wolf C, Rentsch J & Hubner P (1999) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J Agric Food Chem* **47**, 1350-1355.
- [6] Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Fernández A, Lobo E, Hernández PE & Martín R (2001) Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem* **49**, 2717-2721.
- [7] Matsunaga T, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y & Chikuni K (1998) Identification of meat species based on the difference of 18S ribosomal RNA genes. *J Jap Soc Food Sci Technol* **12**, 719-723.
- [8] Hopwood AJ, Fairbrother KS, Lockley AK & Bardsley RG (1999) An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Sci* **53**, 227-231.
- [9] Lockley AK & Bardsley RG (2002) Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Sci* **61**, 163-168.

- [10] Holland PM, Abramson RD, Watson R & Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 7276-7280.
- [11] Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H & Meyer RB (1997) Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucl Acids Res* **25**, 2657-2660.
- [12] Kwok S, Kellog DE, Spasic D, Goda L, Levenson C & Sninsky JJ (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl Acids Res* **18**, 999-1005.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* **25**, 4876-4882.
- [15] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring DNA amplification reactions. *Biotechnol* **11**, 1026-1030.
- [16] Permingeat HR, Reggiardo MI & Vallejos RH (2002) Detection and quantification of transgenes in grains by múltiplex and real-time PCR. *J Agric Food Chem* **50**, 4431-4436.
- [17] Sawyer J, Wood C, Shanahan D, Gout S & McDowell D (2003) Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* **14**, 579-583.
- [18] Walker JA, Hughes DA, Anders BA, Shewale J, Sinha SK & Batzer MA (2003) Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Anal Biochem* **316**, 259-269.
- [19] Walker JA, Hughes DA, Hedjes DJ, Anders BA, Laborde ME, Shewale J, Sinha SK & Batzer MA (2004) Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics* **83**, 518-527.
- [20] Laube I, Spiegelberg A, Butschke A, Zagon J, Shauzu M, Kroh L & Broll H (2003) Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase reaction. *Int J Food Sci Technol* **38**, 111-118.
- [21] Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Hernández PE & Martín R (2004) Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan[®] real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* **52**, 1478-1483.
- [22] Brodmann PD & Moor D (2003) Sensitive and semi-quantitative TaqMan[®] real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci* **65**, 599-607.



Evaluation of post-PCR melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples.

*María López-Andreo, Amando Garrido-Pertierra, and Antonio Puyet**

*Author Address: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, E28040 Madrid, Spain

Corresponding author footnote fax: +34 913943824.

Author email address: apuyet@vet.ucm.es

Publicado en: ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006), 7973-7978.**

ABSTRACT

Real-time uniplex and duplex PCR assays using a SYBR[®] Green I post-PCR melting curve analysis were evaluated for the identification and quantification of bovine, porcine, horse and wallaroo DNA in food products. Quantitative values were derived from threshold-cycle (Ct) data obtained using serial dilutions of purified DNA. The limits of detection in uniplex reactions were 0.04 pg for porcine and wallaroo DNA, and 0.4 pg for cattle and horse DNA. Species-specificity of the PCR products was tested by the identification of peaks in DNA melting curves, measured as the decrease of SYBR[®] Green I fluorescence at the dissociation temperature. The peaks could be distinguished above the background even at the lowest amount of template DNA detected by the C_T method. The system was also tested in duplex reactions, either using single-species DNA or with DNA admixtures containing different shares of two species. The minimum proportions of each DNA species allowing the resolution of T_m peaks in the duplex reactions were 5% (cattle or wallaroo) in cattle/wallaroo mixtures, 5% porcine and 1% horse in porcine/horse mixtures, 60% porcine and 1% wallaroo in porcine/wallaroo mixtures and 1% cattle and 5% horse in cattle/horse mixtures. A loss in the sensitivity of the method was observed for some DNA combinations in the duplex assay. In contrast, the results obtained from SYBR[®] Green I uniplex and duplex reactions with single-species DNA were largely comparable to those obtained previously using species-specific TaqMan[®] probes, showing the suitability of that simpler experimental approach for large scale analytical applications.

TITLE RUNNING HEAD: DNA melting assay for meat identification.

KEYWORDS: Real-time PCR; Species identification; DNA quantification; cytochrome b; horse; wallaroo.

INTRODUCTION

The extensive development of technologies for identification and quantification of nucleic acids over the last decade reflects their importance in diagnostics, forensics and food analysis. The application of fluorescent-based PCR assay formats greatly simplifies protocols for DNA and mRNA detection and quantification by using real-time analysis of PCR products during amplification [1]. Currently, two formats for correlating the amount of DNA template with the fluorescent signal are available. The first one allows specific sequence detection and quantification using fluorescently labelled sequence-specific hybridisation probes. Several types of probes (TaqMan[®] [2], Molecular beacons [3], LightCycler [4], Amplifluor [5]) can be used, based all on fluorescence resonance energy transfer. The second format [6] uses a DNA binding dye, like SYBR[®] Green I, which binds to the minor

groove of the double-stranded DNA in a sequence-independent way. Upon binding its fluorescence increases over 100-fold. While probe-based methods have been shown to be useful for a large variety of analytical applications [7-9], SYBR[®] Green I methods receive similar support due to its lower cost and simplicity [10-12]. The main disadvantage of SYBR[®] Green I methods is caused by the lack of sequence-specificity of the fluorescent signal, which ultimately compels to perform additional verifications of the PCR products, either by electrophoretic separation on agarose gels or by differentiation of the products by melting curve analysis [13], to discard false positive signals due to unspecific amplification or the appearance of primer-dimers.

The identification and quantification of animal species in food and feed products is one of the most rapidly developing fields of application for real-time PCR methods. Several methods have been proposed for the identification and, in some cases, quantification of several mammal, bird and fish species, including beef, porcine, lamb, chicken, turkey, mule duck, goose, ostrich, grouper, wreck fish and Nile perch, either by using fluorescently-labelled probes [8, 14-16] or SYBR[®] Green I methods [10, 12, 17, 18]. While the majority of the SYBR[®] Green I-based PCR methods for identification of species rely on the electrophoretic analysis of PCR products to confirm the specificity of the fluorescent signal, several authors propose the use of post-run melting curve analysis, as a way to avoid the time-consuming and manual transfer operations associated to agarose or polyacrylamide electrophoresis [11, 12, 19]. In addition, some of the proposed methods made use of multiplex PCR reactions, allowing the detection of two or more species (or transgenic material) using a unique PCR reaction premix. Ultimately, assuming a correlation between the T_m peak height (or the area under the peak) and the number of copies of the template DNA in multiplex reactions, it might be possible to estimate the proportions for each species DNA in the mixture. However, the behavior of methods using the melting curve approach on mixed species DNA samples and using multiplex reactions has not been fully evaluated yet.

In a previous work, we showed the feasibility of using a combination of species-specific primers and group-specific TaqMan[®] probes for the detection and quantification of beef, pork, lamb, chicken, turkey and ostrich DNA in complex mixtures [16]. As a single fluorescent probe is shared by several species DNA, the method is significantly cheaper and simpler to run than species-specific probe methods. However, the extension of the method to other species may require the design of sequence-specific probes. The recurring health safety hazards associated to the consumption of meat in the last years have propelled the commercialization of less frequent species in European markets. Here, we have developed an alternative duplex SYBR[®] Green I/melting curve approach for the identification of horse and kangaroo species, for which the use of the common beef/pork/lamb probe was not possible due to the presence of base mismatches at the target sequence. Foremost, the present work aims to evaluate and compare the results obtained with both real-time PCR formats for the detection and identification of meat species.

MATERIALS AND METHODS

DNA extraction

Meat samples were obtained from commercial sources, and the DNA species were confirmed by sequencing the *cytB* gene and its comparison with published sequences at NCBI Embank. The samples of kangaroo meat matched the *cytB* sequence of *Macropus robustus* (wallaroo). DNA was purified from 30 mg of raw material using Puregene® DNA purification kit from Gentra Systems and following the manufacturer protocol for solid tissue samples. Before extraction, muscle samples were ground to a fine powder in a hand-held macerator having first been freeze-dried. Two independent extractions were performed from each sample and DNA was quantified after staining with Picogreen dsDNA quantification reagent (Molecular Probes), using a Perkin-Elmer LS-50B fluorescence spectrophotometer and comparing the fluorescence with that from DNA standards of known concentration.

Primer and probe design

The primers were designed to amplify the mitochondrial region encompassing the 3' end of ND6 and the 5' end of *cytB* gene. The primer sequences were selected in such a way to include at least two species-specific base positions, one of them located at the 3' end of the oligonucleotide. The sequences of primers and probes are summarized in table 1. The amplicon lengths were: Cattle, FBOS3/RBOS1, 92 base pairs (bp); pork, FCSUS1/RSUS2, 100 bp; horse, FEQUS2/REQUS3, 250 bp and wallaroo, FMAC4/RMAC3, 205 bp.

Real-time PCR analysis

DNA detection was performed by amplification using the real-time sequence-detection system 7000 from Applied Biosystems. Reactions were carried out by duplicate in 96-well plates. The 25 µL reaction mixtures contained 12.5 µL of SYBR® Green master mix (which includes the heat-activated AmpliTaq Gold™ enzyme), 2 µL of different dilutions of the DNA mixture, corresponding to 0.010 pg to 50 ng of total DNA and 300 nM of each primer oligonucleotide for uniplex reactions. In duplex reactions the concentrations (nM) were optimized as follows: 150 (cattle)/900 (wallaroo), 150 (cattle)/900 (horse), 300 (pork)/300 (wallaroo), 150 (pork)/900 (horse). The reaction conditions were: 10 min at 95°C for enzyme activation and 50 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 55°C. Readings were taken every cycle and the logarithm of the increment in fluorescence was plotted versus the cycle number. The threshold level was fixed at the same mid-exponential position for all runs. The dissociation curves of the PCR products were monitored using the same instrument, and the derivative of fluorescence values were plotted at 0.1°C intervals from 60 to 95°C. The signal to noise ratio *R* for each species-specific primer pair was calculated using:

$$R = E^{C^s - C^{s,x}} \quad (1)$$

where E is the efficiency of the PCR reaction for each primer pair, C^S is the C_T obtained with the target species DNA, and $C^{S,x}$ is the C_T obtained from a reaction containing the same amount of non-target DNA.

Table 1. Oligonucleotide primers and probes.

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	Target	Reference
Forward primers			
FBOS3	CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG	<i>Bos taurus</i>	[16]
FC1SUS	GAAAAATCATCGTTGTTACTTCAACTACA	<i>Sus scrofa</i>	[16]
FEQUS2	CATCGTTGTATTTCAACTATAAGAACACC	<i>Equus caballus</i>	This work
FMAC4	AAAAACCAATAAAATAGAAAATAAAAAACAACATA	<i>Macropus robustus</i>	This work
Reverse primers			
RBOS1	AAATGTTTGATGGGGCTGGA	<i>Bos taurus</i>	[16]
RSUS2	GGTCAATGAATGCGTTGTTGAT	<i>Sus scrofa</i>	[16]
REQUS3	GGATGAGAAGGCAGTTGTC	<i>Equus caballus</i>	This work
RMAC3	CTGAAATGTTTGAGGGTGCAGG	<i>Macropus robustus</i>	This work
MGB Probe			
S1 (FAM)	CCACCCACTAATAAAA	Consensus <i>Bos taurus</i> , <i>Sus scrofa</i>	[16]

RESULTS AND DISCUSSION

Initial validation of the method

The PCR assay was designed to test the resolution and sensitivity of a SYBR® Green/ melting curve analysis for the identification of mammal species DNA. Horse and wallaroo DNAs were selected as examples of non-commonly marketed species, for which few or no

identification assays are available yet. The inclusion of beef and pork DNA in the assays allows the comparison of results with those reported using different real-time PCR based methods. A DNA alignment showing the positions of primers and probes for all four sequences is displayed in figure 1.

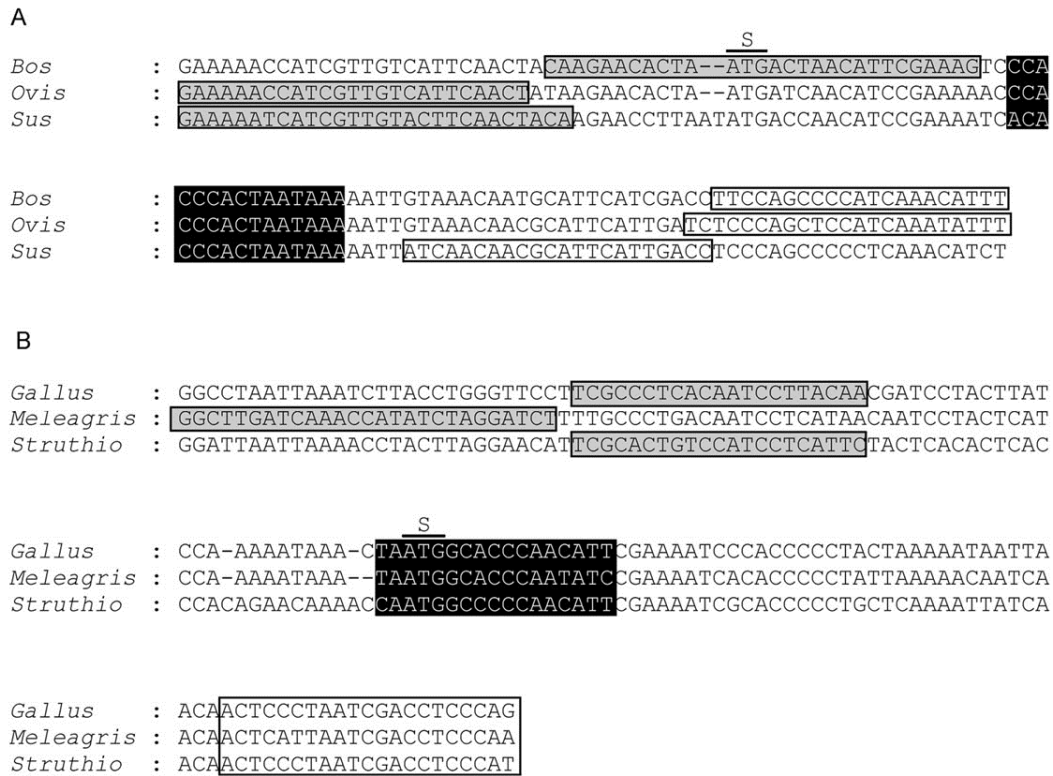


Figure 1. Alignment of the 5' *cytB* region of *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Equus caballus* and *Macropus robustus*. The positions of target sequences for the forward and reverse primers are indicated as shadowed and empty boxes, respectively. Targets for TaqMan® MGB probes for bovine and porcine DNA are labeled as black boxes. S: position of the *cytB* start codon.

The sensitivity, specificity and PCR amplification efficiency for each primer pair using the SYBR® Green I format was calculated by plotting the C_T (cycle threshold) values vs. the logarithm of target DNA amount [1], using serial dilutions of 40 ng of purified DNA from each species. The resulting standard curves are shown in figure 2, and the data derived from the plots are summarized in table 2.

Results obtained using Taqman MGB probes for bovine and porcine DNA are also included for comparison. Real-time PCR data obtained from different primer pairs are fully comparable only when the experimental efficiencies (E) for the different reactions are similar, and approach the theoretical optimum of 2 (one doubling in the number of copies of the target DNA per PCR cycle). The efficiencies found were similar for all four primer pairs, with an average $E = 1.92 \pm 0.10$, which approaches the optimal of one duplication in the number of

copies per cycle. The C_T registered showed a linear correlation with decreasing logarithm of template DNA (coefficient of correlation >0.99) in the range from 40 ng to 0.04 pg for porcine, horse and wallaroo, and 40 ng to 0.2 pg for bovine DNA. As some residual fluorescence could be detected in the negative template controls after the 40th PCR cycle,

the limits for detection in uniplex reactions for these species were established as the amount of template DNA yielding a C_T significantly different ($p \leq 0.05$) from 40 in the linear range of the standard curve. These values were: 0.4 pg for cattle and horse ($C_T = 37.06 \pm 0.61$ and 38.60 ± 0.63 respectively), and 0.04 pg for pork and wallaroo ($C_T = 36.25 \pm 0.68$ and 35.17 ± 0.21 , respectively). Cross-reaction of the primers with unspecific species DNA was checked by running control real-time PCR reactions and calculation of the signal to noise ratio (R) of target to no-target DNA amplification

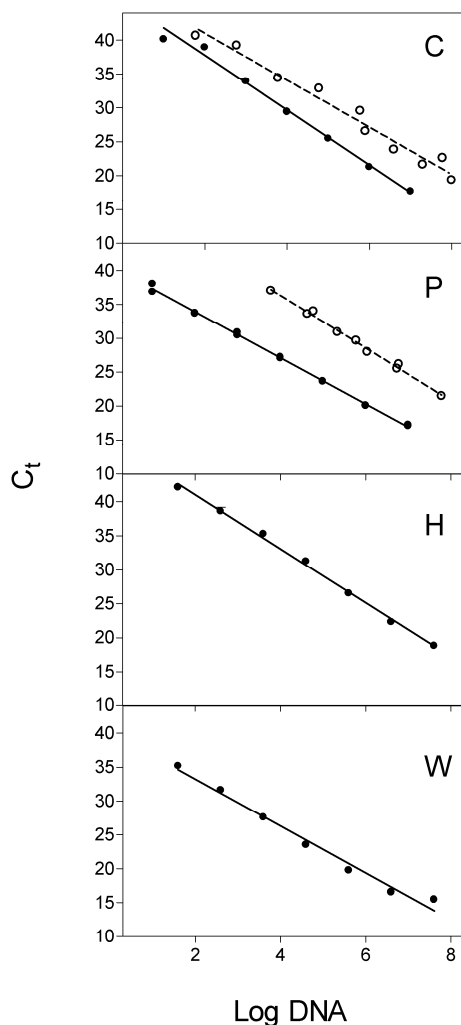


Figure 2. Quantitation ranges and linearity of the PCR assays. The effective ranges for cattle (C), pork (P), horse (H) and wallaroo (W) specific assays are shown using SYBR[®] Green I (solid circles) or S1 TaqMan[®] MGB probe (open circles). Ten-fold dilution series of DNA starting from 40 ng to 0.04 ng were used as standard in the reactions. The average C_T values obtained from three replicates (SD <0.6) are plotted versus the logarithm of template DNA (in fg).

As shown in table 1, the R values obtained using 40 ng of non-specific DNA ranged from 10^{-4} to 10^{-9} . The absence of unspecific amplification products was further confirmed by electrophoresis in agarose gels (data not shown). While the TaqMan[®] approach allows the detection of smaller amounts of cattle DNA than the SYBR[®] Green I protocol, the limit of detection for pork using FCSUS1/RSUS2 primers and SYBR[®] Green I chemistry is similar to that achieved with TaqMan[®] probes. Similar results showing comparable sensitivities for TaqMan[®] and SYBR[®] Green I detection methods have been reported for amplicons based in short interspersed elements in pork DNA [18]. This suggests that, at least for 5'FAM labelled TaqMan[®] Probes, the inherent advantage in the specificity of the fluorescent signal may not necessarily be accompanied by an increase in the sensitivity of the method. The lower limit of detection for horse DNA reported here, five-times lower than the value obtained using the

nuclear growth hormone gene as target gene [14], is likely due to the higher copy number of mitochondrial DNA as template. A different copy number of target mitochondrial DNA among species may be also a possible explanation for the differences found in the cattle and pork limits of detection, however, these differences were not likewise observed when using labelled TaqMan[®] probes. Other explanations, such as SYBR[®] Green fluorescent signal variations depending on the amplicon size and sequence might also explain those differences. Thus, both DNA and detector characteristics and also the labeling approach appear to have an effect on the limit of detection reached.

Table 2. Efficiency and specificity of the real-time PCR reactions.

Primer pairs	Label	Standard curve data			Signal to noise ratio using specific and non-specific DNA ^a			
		Slope	PCR Efficiency	Limit of detection (pg)	Cattle	Pork	Wallaroo	Horse
FBOS3/RBOS1	SYBR [®]	-4.06	1.8	0.40	1	N.D.	10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴
	TaqMan [®]	-3.5	1.9	0.03	1	6x10 ⁻⁵	N.D.	N.D.
FC1SUS/RSUS2	SYBR [®]	-3.40	2.0	0.04	N.D.	1	2x10 ⁻⁷	7x10 ⁻⁶
	TaqMan [®]	-3.88	1.8	0.07	7x10 ⁻⁵	1	N.D.	N.D.
FMAC4/RMAC3	SYBR [®]	-3.32	2.0	0.04	6x10 ⁻⁹	3x10 ⁻⁹	1	N.D.
FEQUS2/REQUS3	SYBR [®]	-3.65	1.9	0.40	2x10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	N.D.	1

ND: not determined

^a Ratio R of target to non-target DNA amplification detected using 40 ng of DNA as template. R values were calculated using equation (1).

The melting curve profiles obtained from the real-time PCR products are shown in the figure 3. Major peaks were observed for each uniplex reaction at 40 ng of template DNA at the following melting temperatures (average $T_m \pm$ standard deviation of four independent measurements): 74.0 \pm 0.2 (cattle), 72.8 \pm 0.2 (pork), 76.0 \pm 0.08 (wallaroo) and 79.1 \pm 0.2 (horse). When limiting amounts of DNA for each assay are used as template, the peaks were likewise distinguished above the background. Remarkably, DNA amounts below the limit of detection by C_T can be identified by the melting curve analysis for cattle, pork and horse. As expected from a PCR final-product, the size of the peaks was approximately constant throughout the standard curve. To assess the specificity of the melting curve analysis when a mixture of DNA from different species is present in the PCR, a control experiment was run by using as template a four-species admixture containing 20 ng of each DNA. The melting curve results for each detector, shown in the figure 4, indicate that the position and

specificity of the peaks are not affected by the presence of non-target DNA. The melting curve results for each detector, shown in the figure 4, indicate that the position and specificity of the peaks are not affected by the presence of non-target DNA

These results validate the use of post-PCR melting curve analysis as a control of the reaction specificity even for complex DNA samples.

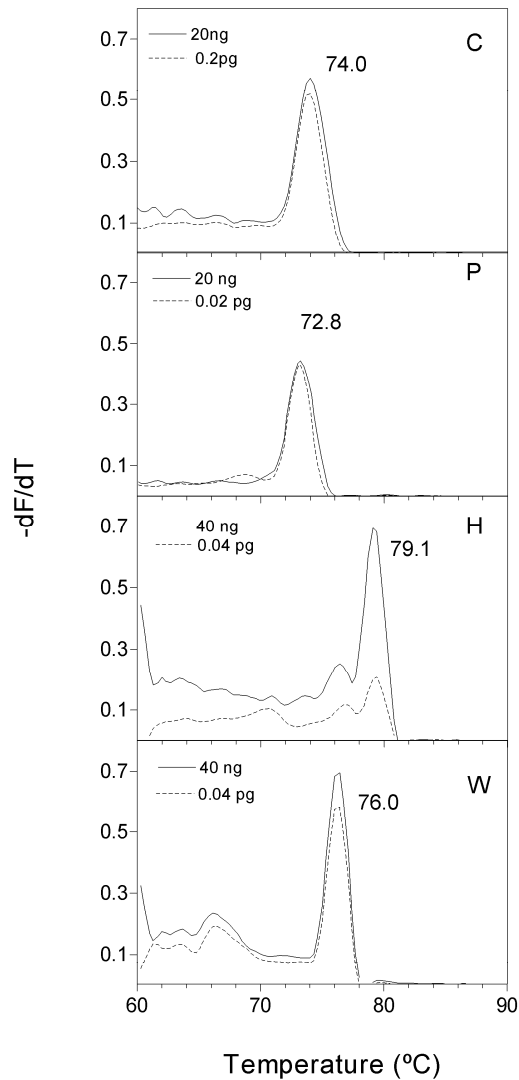


Figure 3. Melting temperature analysis of the PCR products in uniplex reactions. Melting curves for PCR products, obtained using purified DNA from wallaroo (W), horse (H), cattle (C) and pork (P), were transformed into first-derivative melting peaks. Representative results from duplicate experiments are shown for saturating (solid line) and the limiting (dotted line) amounts of template DNA that allow the identification of the peaks. The average T_m

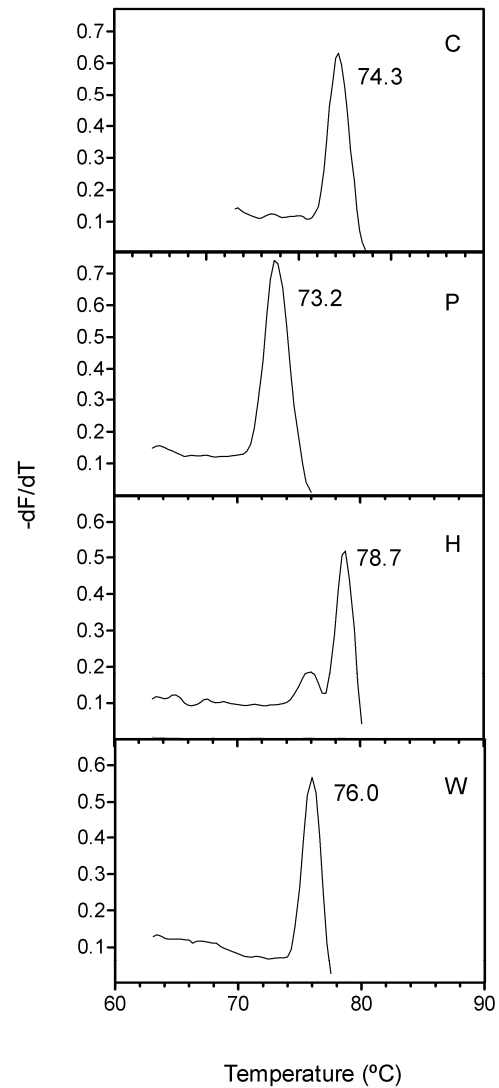


Figure 4. Melting temperature analysis of PCR products in uniplex reactions run on DNA admixtures. First-derivative melting peaks are shown for PCR products obtained using wallaroo (W), horse (H), cattle (C) and pork (P) primer pairs on a DNA mixture containing 20 ng of each beef, pork, wallaroo and horse DNA. The average T_m (°C) values are indicated at the peak position.

Species detection using duplex PCR reactions

Assuming that T_m differences above 2°C may allow discrimination of the PCR products, it was possible to arrange horse-pork, horse-cattle, wallaroo-pork and wallaroo-cattle duplex reactions. As compared to uniplex reactions, no significant up- or downshifts (<0.2°C) of T_m were observed when using duplex reactions on a single species DNA, suggesting that the presence of the extra pair of primers in the PCR do not interfere with the amplification of the specific amplicon (not shown). The ability to detect and discriminate DNA from horse and wallaroo in mixed-template duplex reactions was tested by comparing the melting curves obtained from the PCR products. A series of DNA mixtures, containing (in percentage) 1/99, 5/95, 10/90, 40/60, 50/50, 60/40, 90/10, 95/5 and 99/1 of cattle/horse, cattle/wallaroo, pork/horse and pork/wallaroo, was prepared by duplicate and amplified as before but using duplex PCR systems. The total amount of DNA in the mixtures was 40 ng. As shown in figure 5, the melting curves obtained displayed peaks at the T_m expected for each species. The highest T_m deviation from the uniplex reaction was observed in wallaroo-porcine mixtures, with an average T_m downshift of 0.65 ± 0.07 °C for wallaroo (average of all wallaroo-porcine mixtures). The figure 5 also shows the melting curves of DNA mixtures that allow discrimination of the peaks at the minimum proportions of each DNA species. Thus, the smaller percentage allowing identification of the peaks in double-species duplex reactions were established as follows: 5% (cattle or wallaroo) in cattle/wallaroo mixtures, 5% pork and 1% horse in porcine/horse mixtures, 60% pork and 1% wallaroo in porcine/wallaroo mixtures, and 1% cattle and 5% horse in cattle/horse mixtures. In all cases, 1% corresponds to 0.4 ng of DNA. The criterion for positive identification of the peaks was to observe at least a 1% - dF/dT increment above the baseline at the expected T_m in all duplicates.

The curve profiles also showed that, depending on the species mixture, the height of the peaks did not reflect necessarily the actual proportions of template DNA. Cattle/wallaroo 95/5 mixtures produce comparable peaks, while the signal for porcine DNA is underestimated in porcine/wallaroo mixtures, in such a way that the peak is not detected in mixtures containing less than 50% pork, which corresponds to 20 ng of porcine DNA. In contrast, such amount of DNA template was correctly detected in FCSUS1/RSUS2 uniplex reactions. Similarly, a fair correlation between the relative height of the T_m peaks and the actual proportions of mixed-DNA templates has been reported by others for uniplex reactions detecting two different PCR products [19]. These results suggest that the real-time SYBR[®] Green I format can yield accurate results when either mixed-DNA templates in uniplex reactions or duplex PCR assays on single-DNA templates are used, but the combination of multiplex reactions with mixed-species DNA may produce a sensitivity loss for some DNA combinations. Although duplex reactions on mixed samples require larger amounts of the less abundant species DNA for detection, a 1-5% sensitivity may be sufficient for most practical applications. Identification of genetically modified material by means of duplex real-time PCR followed by melting curve analysis has been shown to be feasible with a sensitivity

of 0.1% [11]. The results reported here indicate that the applicability of this multiplex approach to meat species may largely be dependent on the choice of species to be identified. Such drawback may restrict the widespread use of multiplex SYBR[®] Green I analysis for the identification and/or quantification of species in complex samples. In contrast, the performance (in terms of PCR efficiency, detection limits and resolution of species-specific amplicons) of the SYBR[®] Green I format for uniplex reactions (or duplex reactions on single-species DNA) shown here appears to be comparable to that obtained by utilization of TaqMan[®]-based amplicons. Thus, the lack of correlation between the peak size and the amount of DNA in the sample do not invalidate the use of the SYBR[®] Green-based detectors for quantitative analysis, it just advise against its use in a multiplex format for identification in complex samples. Quantitative data can be derived in any case from C_T values obtained from uniplex reactions. This may promote the use of the SYBR[®] Green I format for uniplex reactions in detriment of fluorescently labeled probes, due to its lower cost and higher simplicity.

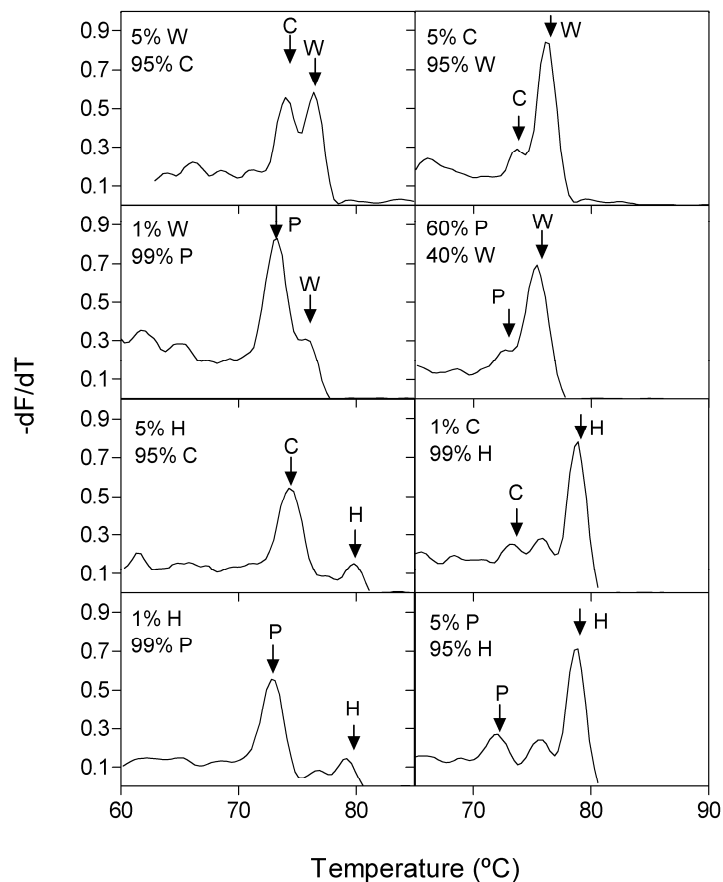


Figure 5. Melting curve analysis of PCR products obtained from duplex reactions on DNA admixtures. The panels show representative results obtained from duplicate independent experiments containing DNA admixtures of wallaroo (W), horse (H), cattle (C) and pork (P) at the percentages indicated. Only the curves corresponding to assays allowing the differentiation of peaks at the lowest percentage for each species DNA are displayed. The position of the T_m values obtained in the uniplex reactions for each species are indicated by arrows.

ACKNOWLEDGMENT

Work supported grant AGL2001-1423 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain.

REFERENCES

- [1] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring DNA amplification reactions. *Biotechnol* **11**, 1026-1030.
- [2] Holland PM, Abramson RD, Watson R & Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 7276-7280.
- [3] Tyagi S & Kramer FR (1996) Molecular beacons probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotech* **14**, 303-308.
- [4] Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Goudry RA & Balis U (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-181.
- [5] Uehara H, Nardone G, Nazarenko I & Hohman RJ (1999) Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. *Biotechniques* **26**, 552-558.
- [6] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA & Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 134-138.
- [7] Rott ME, Lawrence TS, Wall EM & Green MJ (2004) Detection and quantification of roundup ready Soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* **52**, 5223-5232.
- [8] Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Hernández PE & Martín R (2004) Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* **52**, 1478-1483.
- [9] Ballester M, Castelló A, Ibáñez E, Sánchez A & Folch JM (2004) Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques* **37**, 610-613.
- [10] Walker JA, Hughes DA, Hedjes DJ, Anders BA, Laborde ME, Shewale J, Sinha SK & Batzer MA (2004) Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics* **83**, 518-527.
- [11] Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Esteve T, Prat S & Pla M (2003) Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal Biochem* **323**, 164-170.
- [12] Trotta M, Schönhuth S, Pepe T, Cortesi ML, Puyet A & Bautista JM (2005) Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* species) and common substitute species. *J Agric Food Chem* **53**, 2039-2045.
- [13] Ririe KM, Rasmussen RP & Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**, 154-160.

- [14] Brodmann PD & Moor D (2003) Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci* **65**, 599-607.
- [15] Laube I, Spiegelberg A, Butschke A, Zagon J, Shauzu M, Kroh L & Broll H (2003) Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase reaction. *Int J Food Sci Technol* **38**, 111-118.
- [16] López-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI & Puyet A (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **339**, 73-82.
- [17] Sawyer J, Wood C, Shanahan D, Gout S & McDowell D (2003) Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* **14**, 579-583.
- [18] Walker JA, Hughes DA, Anders BA, Shewale J, Sinha SK & Batzer MA (2003) Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Anal Biochem* **316**, 259-269.
- [19] Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ & Macedo AM (2005) Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* **35**, 411-417.



Detection and quantitation of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA.

María López-Andreo^a, Miriam Aldeguer^b, Isabel Guillén^c, José A. Gabaldón^{b,c} and Antonio Puyet^{a}.*

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Centro Tecnológico Nacional de la Conserva, Molina de Segura, Murcia, Spain

^c Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), Murcia, Spain.

* Corresponding author. Tel: +34 913943827; Fax: +34 913943824

Email address: apuyet@vet.ucm.es

Publicado en: ***Food Chemistry*, 134 (2012) 518–523.**

ABSTRACT

Analytical methods for the detection and quantitation of species in processed food are not yet fully established due to the negative effects of heat treatments on the targeted proteins and DNA, which compromises immuno- and PCR-based detection methods. Here, real-time PCR (qPCR) detectors based on Minor Groove Binding (MGB) were used to test their ability to detect and quantify pork DNA in beef/pork meat binary mixtures subjected to cooking and sterilization. A single-point matrix standard strategy allowed calibration of qPCR results for direct quantitation of meat proportions in binary mixture. The correlation between heat treatment and the extent of DNA degradation was also experimentally tested. Cooking at 65 °C followed by sterilization at 126 °C from 10 to 30 min led to DNA rupture to approximately 100 bp-long fragments, which still allowed detection of 5% pork and its accurate quantitation in binary mixtures. The results demonstrate the capability of short qPCR detectors for quantitation of meat products in processed food, and illustrate the necessity to include matrix-adapted standards in the assay.

KEYWORDS: Real-time PCR, Species identification; Beef; Pork; DNA degradation; heat sterilization.

INTRODUCTION

Food products composed of combinations of pork and beef meat are widely consumed around the world, and accurate labeling of these products is important to support fair-trade. Meat fraud often concerns deviations from declared ingredients, like lower contents of veal meat depending on market prices. To enforce the adherence to quality regulations, accurate and robust analytical methods are required in control laboratories. To date, both DNA-based real time PCR (qPCR) methods and protein-based immunodetection methods have shown to be the best choices for routine detection and quantification of meat species in food products. qPCR may be used both for detection [1-4] and quantitation [5-8] of species-specific DNA in meat foods. Conversely, animal protein can be detected by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) methods which, while do not reach the same sensitivity and specificity of DNA methods, are quicker and cheaper for routine analysis [9, 10]. The use of these methods in highly processed foods is commonly limited due to protein denaturation. Notwithstanding, new developments using antibodies raised to heat-resistant glycoproteins (ELISA-TEK®) may allow the widespread use of antibody-based methods for detection of species in food products, although their use in quantitative assays has not been fully demonstrated.

Food processing at high temperatures also leads to DNA fragmentation [11], which may hamper detection and quantitation by PCR methods. To avoid this, the use of short amplicons is usually preferred, although it has been shown that amplicons around 350 base

pairs are still adequate for highly processed meat samples [12]. PCR-based species detection on processed food and feed has been mostly developed for canned food [1, 13], cooked sausages [1, 14] or meat and bone meal [4, 15]. DNA fragmentation after heavy heat treatment, which leads to lack of PCR amplification, has also been proposed as a tool for determination of prophylactic treatment of animal meals [16]. These studies showed the feasibility of using PCR techniques for qualitative detection of species in processed food and animal meals, but little information is available on the effects of meat cooking and sterilization processes on qPCR quantitation techniques. There are reports on species quantitation in mildly cooked food [8, 17] or plant transgenic quantitation after high temperature processing [18] showing that, under these conditions, it is possible to obtain quantitative information by using qPCR.

Accurate measurements of meat proportions in samples are however compromised by the variety of tissue types used in food manufacturing. DNA fractions may not correlate with meat content in the sample if the method is calibrated with DNA obtained from tissues (fatty bacon, fatless muscle, connective tissue) different to those present in the sample. To address this problem, the use of matrix-adapted standards has been recently proposed [19]. Such approach requires the production of food calibrators, such as sausages with known proportions of target meat species, to render accurate and reproducible quantitative results.

We have previously shown that detectors composed by a combination of species-specific oligonucleotide primers and a single Minor Groove Binding (MGB) probe allowed the detection and accurate quantitation of beef and pork DNA in DNA admixtures by qPCR [20]. Compared to standard Taqman[®] hydrolysis probes, MGB probes allow the use of shorter high-specific oligonucleotide sequences [21, 22] which should be suitable for amplification of highly fragmented DNA. MGB-probe based detectors targeting beef and pork are tested in this work on standardised mixtures of beef and pork meat, both of raw and cooked/sterilized, to ascertain their ability to render accurate quantitative results. In addition, the effects of cooking and heat sterilization on DNA fragmentation in these samples was also assayed, allowing to correlate the extent of DNA damage by cooking procedures and the PCR outcome.

MATERIALS AND METHODS

Meat samples

Fresh meat (muscle tissue) samples were obtained from commercial sources and stored frozen at -20 °C until use. Binary mixtures of beef and pork were prepared by combining appropriate quantities of minced, lean meat. Two series of meat balls of each mixture were prepared: T (cooked and sterilized) and F (non-cooked control). T series samples were fried in vegetable oil at 65°C for 15 min, canned and sterilized at 121°C for 30 min. The canned samples were kept at room temperature until use. Untreated control F series were neither cooked nor sterilized and were kept frozen at -20 °C until use.

DNA extraction

T and F samples were freeze-dried and ground to a fine powder in a hand-held macerator. DNA was purified from 30 mg of meat using either Puregene® DNA purification kit from Quiagen, or NucPrep DNA Chemistry for Tissues on a 6100 Nucleic Acid Prep Station both from Applied Biosystems, following the manufacturers protocols for solid tissue samples. DNA content was quantified after staining with Picogreen dsDNA quantification reagent (Molecular Probes), using a Perkin-Elmer LS-50B fluorescence spectrophotometer and comparing the fluorescence with that from DNA standards of known concentration. DNA for qPCR standard curves and DNA digestions was purified from meat samples previously authenticated by DNA sequencing of a mitochondrial ND5-*cytB* region [23].

Real-time PCR

DNA detection and quantification was performed by amplification using a real-time sequence-detection system 7000 from Applied Biosystems. Reactions were carried out by duplicate in 96-well plates. Primers and probes targeting mitochondrial DNA of *Bos taurus* or *Sus scrofa* were previously described [23], and are summarized in Table 1. Combinations of the S1 probe with either FBOS3/RBOS1, FBOS3/RBOS2, FBOS3/RBOS3 or FC1SUS/RSUS2 primers were used to formulate the detectors BOS1 (92 bp), BOS2 (204 bp), BOS3 (319 bp) and SUS (100 bp), respectively. The 25 μL reaction mixtures contained 12.5 μL of Taqman® master mix (which includes the heat-activated AmpliTaq Gold™ enzyme), 300 nM of each specific oligonucleotide primer, 200 nM of MGB probe, and 2 μL of DNA (1 pg μL^{-1} to 30 ng μL^{-1}). The reaction conditions were as follows: 10 min at 95 °C for enzyme activation and then 50 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing at 55 °C for 1 min. Readings were taken at every cycle and the increment in fluorescence was plotted versus the cycle number. To test for cross-species DNA amplification, all PCR runs included at least three independent non-target DNA control reactions (NTD) for each detector, containing 4 ng of beef (or pork), chicken or turkey DNA. The fluorescence threshold was fixed at the same mid-exponential level for all runs.

Meat species quantification

To quantify the proportion of pork in beef:pork the binary mixtures, standard curves using dilutions of beef and pork DNA and BOS1 and SUS detectors were firstly obtained by plotting C_T vs. log DNA, and the slope m and intercept b were calculated for both species. qPCR amplifications were then carried out in duplicate using 2 ng μL^{-1} of DNA obtained from F and T binary mixtures, and the mean C_T registered by BOS1 detector were interpolated in the corresponding standard curve to obtain the beef DNA content in the sample (N_{BOS}).

Table 1. Oligonucleotide primers and probes.

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	Target
Forward primers		
FBOS3	CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG	Bovine
FC1SUS	GAAAATCATCGTTGTACTIONTCAACTACA	Porcine
Reverse primers		
RBOS1	AAATGTTTGATGGGGCTGGA	Bovine
RBOS2	AATGCTGTTGTTGTGTCGGA	
RBOS3	CCTCGTCCTACGTGCATATATAA	
RSUS2	GGTCAATGAATGCGTTGTTGAT	Porcine
MGB Probe		
S1	CCACCCACTAATAAA	Bovine, porcine

The C_T recorded by SUS detector were not directly interpolated on the standard curve, instead, the 50:50 beef:pork samples were used as matrix reference to calibrate the differences in DNA content for equal amounts of beef and pork meat. This difference, D , was defined as the number of cycles which needs to be added to the experimental SUS C_T and interpolated on the corresponding standard curves to obtain the same amount of DNA detected by BOS1 in the 50:50 sample. Thus, if the standard curves are defined by $C_T = m \log N + b$ [24], D can be calculated as:

$$\frac{C_{Tb50} - b_{beef}}{m_{beef}} = \frac{C_{Tp50} - b_{pork} + D}{m_{pork}}$$

$$D = m_{pork} \left(\frac{C_{Tb50} - b_{beef}}{m_{beef}} \right) + b_{pork} - C_{Tp50} \quad (1)$$

where C_{Tb50} and C_{Tp50} are the C_T obtained with BOS1 and SUS detectors, respectively, from the 50:50 matrix reference. Using this approach, D_F and D_T values were calculated for non-processed and processed samples to obtain the proportion of pork in the F and T samples, respectively. The adjusted amount of pork DNA in any sample can then be inferred from:

$$N_{cSUS} = 10^{\frac{C_T - b_{pork} + D}{m_{pork}}}$$

And the proportion of pork meat in the sample as:

$$P_{pork} = 100 \times N_{cSUS} / (N_{BOS} + N_{cSUS}) \quad (2)$$

DNA digestion conditions

Calf thymus DNA (10 µg, Sigma-Aldrich) were digested with 10^{-3} to 2×10^{-4} U μL^{-1} of DNase I (RNase free, 5KU at 1 U μL^{-1} , Epicentre Technologies) for 10 min at 37° in 500 µL of digestion buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH=7.5), 10 mM MgCl_2 and 50 µg mL^{-1} BSA. All the digestions were carried out by duplicate. The reaction was stopped by addition of 25 µL of 0.5 M EDTA pH 8 and incubation at 100 °C for 10 min, followed by phenol/chloroform extraction and DNA precipitation by adding one volume of 1,2-propanol. The pellet was washed with 70% ethanol and DNA was rehydrated by adding 20 µL water and incubating overnight at 4 °C. A sample without enzyme was prepared as control to normalize the results. The size range of resultant DNA fragments was monitored by electrophoresis in 1.5% agarose at 20V and staining with 1 µg mL^{-1} of ethidium bromide solution in TAE buffer [25]. For qPCR assays, 2 µL of a 20 ng μL^{-1} dilution of digested DNA were used as template.

Meat immunodetection

Identification of beef and pork was performed using ELISA kits (BioKits) for raw (ref. 902032G) or cooked (ref. 902027Y) foods from Tepnel Biosystems Ltd. (Stamford, CT, USA) according to the manufacturer's instructions. Before extraction, raw and coked samples were chopped and homogenized in an Osterizer blender (Milwaukee, WI, USA). 5g of each homogenized sample was placed in a sterile plastic tube containing 50 mL of 0.9% NaCl and the mix was vigorously shaken for 30 s. After 10 min at room temperature, the extracts were then conditioned by diluting 1/10 (v/v) in phosphate buffered saline (10 mM phosphate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4). 100 µL of each reconstituted extract was checked by ELISA. Washing steps were carried out using a 12-channel microplate washer from Nunc (Roskilde, Denmark). Absorbance was read with a Spectra MAX340pc microplate reader from Molecular Devices (Toronto, Canada) at 450 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Linearity and sensitivity of meat detectors on processed samples

Previous results in our laboratory showed that the Taqman[®] MGB-based detectors BOS1 and SUS, when used on single-species or mixed DNA purified from fresh meat, yielded a linear correlation of C_T vs. log DNA, with a PCR efficiency nearing one doubling per cycle [23]. To test the possible effects of meat cooking and heat sterilization procedures, as well as the presence of non-target DNA in the sample, on the linear response of the detectors, new linearity tests were performed by triplicate using DNA obtained from non-mixed or mixed (50:50) meat samples, both cooked and sterilized (T) or non-treated (F). The measured PCR efficiencies for both BOS1 and SUS detectors on 50:50 mixtures (2.2 ± 0.2 and 2.0 ± 0.3 , respectively) were not statistically different ($p > 0.05$) from those observed on pure beef or pork meat (2.0 ± 0.1 and 2.3 ± 0.3 , respectively). Similarly, no differences were observed in thermally treated T samples (2.2 ± 0.1 for BOS1 and 2.1 ± 0.3 for SUS on 50:50 mixtures).

Thus, it could be concluded that the cooking and the sterilization processes used do not affect significantly the response of qPCR to different concentrations of DNA, and that the presence of non-target DNA in the meat admixtures do not affect the PCR efficiency.

The linearity of response was also tested using DNA obtained from the F and T series samples containing different proportions of beef and pork meat. DNA (4 ng) obtained from each mixture was used in qPCR reactions and the C_T values plotted versus the logarithm of target meat proportion. As shown in figure 1, a high linear correlation was obtained in non-

treated F samples ($R = 0.99$), while slightly lower correlation was observed in the curves obtained from the T series mixtures ($R = 0.98$). This linear response for both processed and unprocessed products proves that BOS and SUS detectors can be used on matrix-adapted standards to build calibration curves suitable for quantitative determination of beef and pork meat contents. An estimate of the limit of detection for beef and pork in binary mixtures under these conditions was calculated as $LOD_{CT} = C_{T\ NTD} - 3 \times \sigma\ NTD$, where LOD_{CT} is the maximum C_T allowing detection of the target DNA, and $C_{T\ NTD}$ and $\sigma\ NTD$ are the mean C_T and standard deviation of NTD controls. The minimum percent of meat that can be detected was calculated by interpolation of LOD_{CT} in the corresponding standard curve, yielding 2% for beef and 7% for pork,

both in T and F series samples. To confirm these LOD values, C_T values obtained from the T and F containing 0.1, 1 or 5% of beef or pork were compared to the control samples containing only beef or pork. The results, displayed in Table 2, showed that C_T values from samples containing 1% beef, either treated or untreated, were significantly different to non-beef controls ($p < 0.05$), while 1% pork could only be reliably detected in non-treated samples, with a $LOD > 5\%$ in processed meat. These values are in agreement with those from other reported qPCR methods developed for detection of beef or pork in meat mixtures: 0.5-1% sensitivity for low processed meat products [3, 14, 26], and ~5% for cooked/sterilized matrices [14].

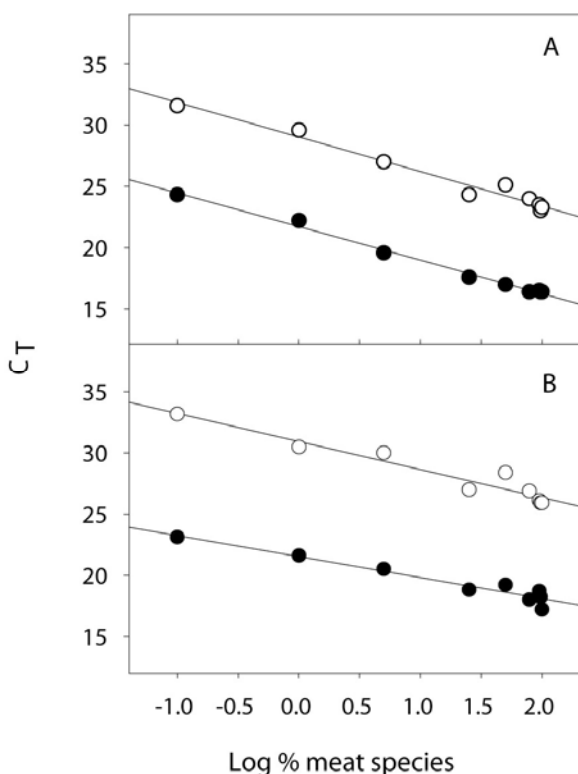


Figure 1. Correlation of species-specific amplification of DNA and the content of beef and pork in the binary mixtures. C_T vs. log of beef or pork meat percent was obtained by qPCR amplification using BOS (A) or SUS (B) detectors and 4 ng of total DNA as template from untreated F (white) or heat-treated T (black) mixtures.

Table 2. Limit of detection of BOS and SUS detectors on beef/pork meat binary mixtures.

Species	C_T F series			C_T T series		
	Control NTD	% especies		Control NTD	% especies	
		0.1	1.0		1.0	5%
Beef	26 ±2	24.3 ±0.7 (0.27) ^a	22.2 ±0.9 (0.024)	28 ±2	26 ±2 (0.267)	23 ±1 (0.017)
Pork	26 ±2	24 ±1 (0.205)	22.2 ±0.6 (0.026)	31 ±2	28 ±2 (0.158)	27 ±2 (0.082)

Mean C_T values obtained from 4 independent experiments using 4 ng of DNA as template.

a) t-distribution p values of sample *vs.* control are given in parenthesis.

To compare the results obtained using qPCR with the performance of immunodetection-based methods, the same samples were analyzed using a commercial ELISA method for beef and pork. As shown in the figure 2, only the F samples produced consistent antigen recognition in the assays, with a detection limit approaching 1%, while the T meat mixtures failed in general to detect any of the two species, likely due to denaturation of the antigenic target during sterilization treatment. The limit of detection was estimated at 1% (beef, pork, and poultry) by analysis of 5 sets of 12 replicates of the zero standards. The mean absorbance value minus 3-fold SD was equivalent to a 0.9 fold the signal in absence of analyte [27], which corresponds to an estimated limit of detection of 0.32 ng/ml of meat species.

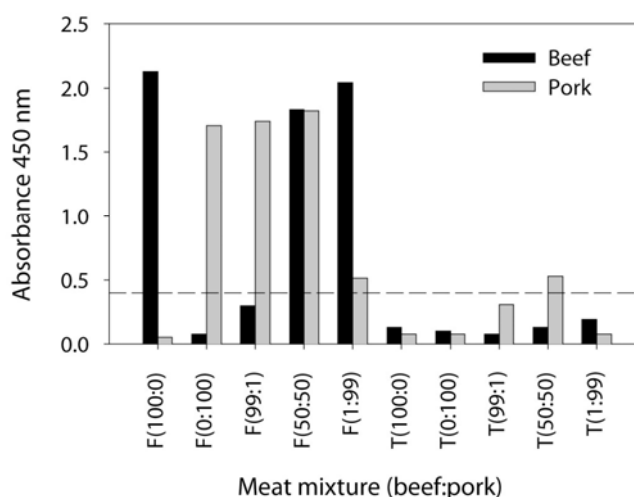


Figure 2. Immunodetection of beef and pork in F and T meat samples. Extracts of the non-processed F and processed T samples of known composition were tested using ELISA kits for beef and pork meat. The cut off was established as three times the standard deviation from the mean measurement of the blank. The mean absorbance of triplicate measurements (relative standard deviation <10%) are shown.

Meat species quantitation using single-point reference matrix

The main disadvantage of DNA-based methods for the quantitation of proportions of different species in foods derives from the variability of DNA concentration (number of copies of target DNA per gram of material), which depends both on the species and the type of tissue present in the sample. In the case of meat products, equal amounts of beef and pork lean muscle may not contain the same number of copies of target DNA [23]. It has also been shown that the use of DNA extracted from matrix-adapted reference material containing different proportions of meat species yields more accurate results than the use of DNA dilutions to build calibration curves [8]. Accordingly, the standard curves shown in the figure 1 may be directly used to interpolate qPCR values obtained from DNA extracted from mixtures of beef and pork lean meat to ascertain the proportions of each species. However, producing matrix-adapted reference materials to build calibration curves may be time-consuming and increase the cost of the assay when many different types of mixtures are required. To simplify the experimental procedure, the combination of DNA dilution standard curves with qPCR data from a single matrix reference material might be used to obtain reliable quantitative data. Differences in target copy number between two species or tissues may be accounted as differences in C_T , and can be used to calculate the actual species ratio in the meat binary mixtures. To this end, the differences D_F and D_T were calculated using the expression [1], using the C_T recorded from the F(50:50) and T(50:50) mixtures, respectively, and the m and b parameters from the standard curves for DNA dilutions of pure beef and pork meat. The calculated values, $D_F = -12.1$ cycles and $D_T = -14.3$ cycles, were used to obtain the adjusted N_{cSUS} values for each binary mixture and the proportion of pork in those mixtures was obtained from expression [2]. The results, plotted in the figure 3, showed good correlation ($R = 0.95$) between the real and qPCR-quantified content of pork both for both the F and the T binary mixtures. The accuracy, calculated as the relative mean deviation (in % of the true value of pork meat) for all runs was 17% and 13% for F and T samples, respectively. These accuracy values are similar to those reported for methods involving the use of matrix-adapted standards on low-processed products [19, 28].

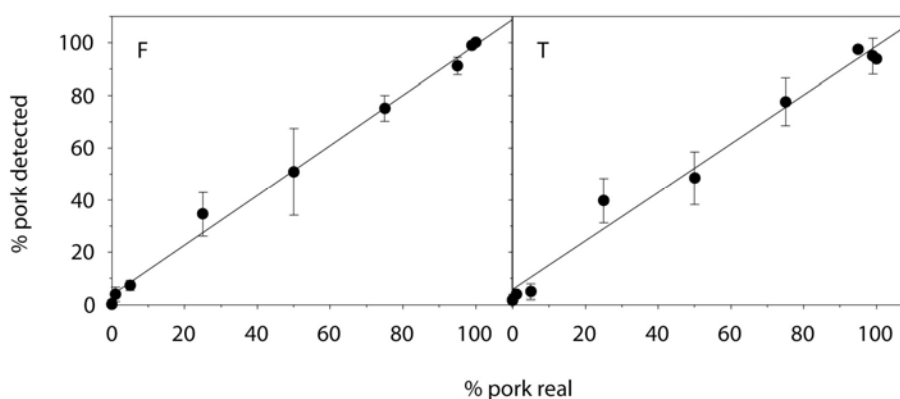


Figure 3. Quantitation of pork in beef:pork binary mixtures using 50:50 matrix standards for calibration. The percent of pork in F and T series samples were calculated using equation (2). Results shown are the mean of 4 independent assays \pm SD.

The observed difference, of approximately two cycles, in D values for treated and non-treated samples reflects a four-fold decrease of amplifiable pork DNA in treated mixtures as compared to beef DNA. This suggests that heat processing may affect differently to the amplification of each species present in the mixture, and strengthens the importance of using matrix-processed standards to calibrate any qualitative or quantitative assays based on qPCR.

Compared to other reported methods, which require the production of matrix-adapted reference materials encompassing the whole range of expected meat proportions [19], the cloning of DNA target sequences or the account of genome sizes [7], the use of single-point reference matrix in qPCR-based food assays as exemplified here may simplify the experimental set up and data processing for species quantitation. This approach could be easily transferred to the quantitation of other food products, as it would only require a single set of qPCR standard curves using DNA dilutions from reference samples of each species to be analyzed, which can be used to test different matrices, and a single-point qPCR reaction using DNA from a matrix-adapted sample of known composition.

Correlation between meat processing, DNA fragmentation and PCR amplification in processed samples

The data shown in the figure 3 suggest that the food processing used in these tests, which involves cooking at 65 °C followed by heat sterilization at 121 °C for 30 min do not affect significantly the quantitative results obtained by qPCR. There is, however, strong evidence indicating that such heat treatment should produce a significant fragmentation of DNA [12, 16]. To get an indication of the DNA damage produced by the cooking and heat treatment, a DNase-controlled experiment was devised to test the effects of DNA fragmentation on the qPCR results. Five DNA digestions using DNaseI (10^{-3} to 2×10^{-4} U μl^{-1}) were carried out to obtain different extents of degraded calf thymus DNA. The extent of fragmentation was confirmed by electrophoresis through agarose gels and staining with ethidium bromide (not shown). Two additional detectors BOS2, and BOS3, targeting DNA sequences of 204 and 319 bp, respectively, were designed to test amplification on DNA fragments longer than those targeted by BOS1. The amplification efficiencies for BOS2 and BOS3 were measured and found to be significantly similar to that of BOS1 and were considered equal to one duplication per cycle for all three detectors. The resulting DNaseI digestions were used as templates in qPCR reactions using the BOS1, BOS2 and BOS3 detectors. Differences in amplification (r) due to the shortening of DNA fragments after DNaseI digestion were quantified by comparison with the amplification obtained in non-DNaseI samples, using the BOS1 detector as reference as follows:

$$r_{1-2} = 2^{(CT1-CT2)_{treated} - (CT1-CT2)_{untreated}} ; r_{1-3} = 2^{(CT1-CT3)_{treated} - (CT1-CT3)_{untreated}} \quad (3)$$

where C_{T1} , C_{T2} and C_{T3} are the C_T obtained using BOS1, BOS2 and BOS3 detectors in the corresponding DNaseI treated and untreated calf thymus DNA. The results, shown in the figure 4A, indicate that, even at the lowest concentration of DNaseI used ($2 \times 10^{-4} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), the amount of DNA amplified by the 204 bp BOS2 detector was nearly one fourth of the DNA amplified in the undigested DNA. DNA detected by the 319 bp BOS3 detector was about half of the DNA detected by BOS2 at this digestion level, suggesting that most DNA fragments were shorter than 300 bp. As expected, at $4 \times 10^{-4} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ of DNaseI, the amount of BOS2 detected DNA was reduced, but no significant differences were observed for BOS3 as compared to the lowest concentration of DNaseI tested, indicating that some DNA fragments remain undigested even at high DNaseI concentrations. In fact, as can be seen in the figure 4A, treatments with higher amounts of enzyme appear to reduce the hydrolysis of DNA, probably by inhibition of enzyme activity at high concentrations. The results obtained on digested DNA shows that BOS detectors can be used to get an estimate of DNA degradation in processed meat products. To test this, beef meat samples were cooked and heat treated under different conditions, and r values accounting for DNA degradation were obtained using the BOS detectors. The results, shown in the figure 4B, indicate that, while frying in vegetable oil at $65 \text{ }^\circ\text{C}$, even for long periods of time, do not affect significantly the amplification with BOS2, it reduces the amount detected with BOS3. This suggests that, under these conditions, most DNA is present in fragments of 200 to 300 bp. Sterilization at $126 \text{ }^\circ\text{C}$, even for short periods of time, reduces drastically the signal recovered by both BOS2 and BOS3, which suggests the occurrence of DNA fragmentation below 200 bp on the average. Since the treated binary mixtures of the T series were subjected to cooking and heat sterilization for 30 min. and still DNA could be detected and quantitated, it may be inferred that, despite the extensive DNA fragmentation, enough copies of 100 bp-long fragments remain available to be targeted by the BOS1 detector and yield quantitative qPCR results. Furthermore, the use of a matrix-adapted mixture, which is subjected to the same heat treatment as the samples to be analyzed, as reference material to calibrate the ratios of target species DNA in a given meat proportion allows to circumvent the expected loss of accuracy due to the reduction of suitable target sequences, even if the processing leads to different degradation rates of the DNA species, as the dissimilarities in the D values observed for treated and not-treated samples suggest.

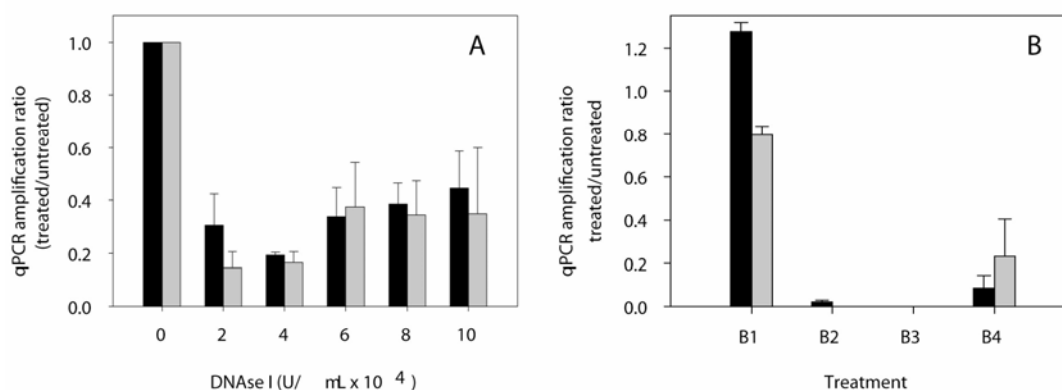


Figure 4. DNA amplification by qPCR on DNA-degraded samples. A. Amplification on DNaseI-digested calf thymus DNA. The ratio of not-digested to digested DNA amplification was obtained after incubation with different concentrations of DNaseI.. B. Amplification on beef meat samples fried in vegetable oil at 65 °C for 30 min. followed by sterilization at B2: 126 °C for 10 min; B3: 20 min and B4: 30 min. B1: non-sterilized control. Ratios $r_{1,2}$ (black) and $r_{1,3}$ (grey) were calculated using equations (3).

CONCLUSIONS

Data collected in this report supports the suitability of qPCR methods for species quantitation, even on heavily processed food products. The use of controlled matrix standards to get quantitative information on the factors which affect the output of qPCR, as exemplified in this work, allows to overcome the weaknesses usually associated with the use of DNA methods for quantitation of food components, such as target concentration variability and fragmentation derived from heat treatments. This approach may help to improve the design of robust methods for species quantitation in processed food.

ACKNOWLEDGMENT

Work supported by grant 2I04SC021 from the Autonomous Community of Murcia, Spain, and the UCM-Santander Program n. 920267 project.

REFERENCES

- [1] Brodmann PD & Moor D (2003) Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci* **65**, 599-607.
- [2] Mendoza-Romero L, Verkaar ELC, Savelkoul PH, Catsburg A, Aarts HJM, Buntjer JB & Lenstra JA (2004) Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J Food Protect* **67**, 550-554.
- [3] Dooley JJ, Paine KE, Garret SD & Brown HM (2004) Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci* **68**, 431-438.

- [4] Fumiere O, Dubois M, Baeten V, von Holst C & Berben G (2006) Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem* **385**, 1045-1054.
- [5] Palisch A, Mergemeier S & Kuhn M (2003) A real-time PCR system for the relative quantitation of beef and pork contents in meat containing food. *Fleischwirtschaft* **83**, 153-156.
- [6] Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Hernández PE & Martín R (2004) Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* **52**, 1478-1483.
- [7] Laube I, Zagon J & Broll H (2007) Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int J Food Sci Technol* **42**, 336-341.
- [8] Eugster A, Ruf J, Rentsch J, Hubner P & Koppel R (2008) Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. *Europ Food Res Technol* **227**, 17-20.
- [9] Asensio L, Gonzalez I, Garcia T & Martin R (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* **19**, 1-8.
- [10] Giovannacci I, Guizard C, Carlier M, Duval V, Martin JL & Demeulemester C (2004) Species identification of meat products by ELISA. *Int J Food Sci Technol* **39**, 863-867.
- [11] Meyer R, Candrian U & Lüthy J (1994) Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR). *J AOAC Int* **77**, 617-622.
- [12] Hird H, Chisholm J, Sanchez A, Hernandez M, Goodier R, Schneede K, Boltz C & Popping B (2006) Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam* **23**, 645-650.
- [13] Bottero MT, Dalmaso A, Cappelletti M, Secchi C & Civera T (2007) Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *J Biotechnol* **129**, 575-580.
- [14] Laube I, Spiegelberg A, Butschke A, Zagon J, Shauzu M, Kroh L & Broll H (2003) Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase reaction. *Int J Food Sci Technol* **38**, 111-118.
- [15] Prado M, Berben G, Fumiere O, van Duijn G, Mensinga-Kruize J, Reaney S, Boix A & von Holst C (2007) Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: Result of an interlaboratory study. *J Agric Food Chem* **55**, 7495-7501.

- [16] Kingcombe CIB, Luthi E, Schlosser H, Howald D, Kuhn M & Jemmi T (2001) A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions for animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci* **57**, 35-41.
- [17] Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Fernández A, Lobo E, Hernández PE & Martín R (2001) Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem* **49**, 2717-2721.
- [18] Bergerová E, Hrcirova Z, Stankovska M, Lopasovska M & Siekel P (2010) Effect of Thermal Treatment on the Amplification and Quantification of Transgenic and Non-transgenic Soybean and Maize DNA. *Food Anal Methods* **3**, 211-218.
- [19] Eugster A, Ruf J, Rentsch J & Koppel R (2009) Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol* **230**, 55-61.
- [20] López-Andreo M, Garrido-Pertierra A & Puyet A (2006) Evaluation of post-PCR melting temperature analysis for meat Species identification: fish in mixed DNA samples. *J Agric Food Chem* **54**, 7973-7978.
- [21] Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H & Meyer RB (1997) Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucl Acids Res* **25**, 2657-2660.
- [22] Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB & Hedgpeth J (2000) 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucl Acids Res* **28**, 655-661.
- [23] López-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI & Puyet A (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **339**, 73-82.
- [24] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring DNA amplification reactions. *Biotechnol* **11**, 1026-1030.
- [25] Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [26] Rodríguez MA, García T, Gonzalez I, Hernandez PE & Martín R (2005) TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Sci* **70(1)**, 113-120.

- [27] Gabaldon JA, Maquieira A & Puchades R (2007) Development of a simple extraction procedure for chlorpyrifos determination in food samples by immunoassay. *Talanta* **71**, 1001-1010.
- [28] Köppel R, Zimmerli F & Breitenmoser A (2009) Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *Eur Food Res Technol* **230**, 125-133.



Detection of mandarine in orange juice by single-nucleotide polymorphism qPCR assay.

Miriam Aldegue^a, María López-Andreo^b, Isabel Guillén^c, José A. Gabaldón^{a,c} and Antonio Puyet^{b}.*

^a Centro Tecnológico Nacional de la Conserva, Molina de Segura, Murcia, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), Murcia, Spain.

* Corresponding author. Tel: +34 913943827; Fax: +34 913943824

Email address: apuyet@vet.ucm.es

Manuscrito en revisión en ***Food Chemistry***.

ABSTRACT

A dual-probe real time PCR (qPCR) DNA-based analysis was devised for the identification of *Citrus reticulata* (mandarin) in orange (*Citrus sinensis*) juice. A single nucleotide polymorphism was confirmed on nine orange and thirteen mandarin Spanish commercial varieties at the trnL-trnF intergenic region of the chloroplast chromosome. Two short minor-groove binding fluorescent probes targeting the polymorphic sequence were used in the dual-probe qPCR, which allowed the detection of both species in single-tube reactions. The similarity of PCR efficiencies allowed a simple estimation of the ratio mandarin/orange in the juice samples, which correlated to the measured difference of threshold cycle values for both probes. The limit of detection of the assay was 5% of mandarin in orange juice, both when the juice was freshly prepared (not from concentrate) or reconstituted from concentrate, which would allow the detection of fraudulently added mandarin juice. The possible use of the dual-probe system for quantitative measurements was also tested on fruit juice mixtures. qPCR data obtained from samples containing equal amounts of mandarin and orange juice revealed that the mandarin target copy number was approximately 2.6-fold higher as compared to orange juice. However, the use of a matrix-adapted control as calibrator to compensate the resulting C_T bias allowed obtaining accurate quantitative measurements.

KEYWORDS: species identification, food quality, real-time PCR, MGB probe, citrus, adulteration.

INTRODUCTION

Sensitive and reliable methods are increasingly needed for authentication of food products, which may help to prevent either accidental or fraudulent substitutions during food manufacturing or commercialization. Inadequate cleaning of food process equipment and containers may result in accidental substitutions. Fraudulent substitution commonly arises as a result of the deliberate extension of products with cheaper additives. Common adulteration in fruit juices may be caused by water addition or excessive dilution of concentrates, sugar or pulpwash addition, the use of colorants or other additives to make appear another juice which sells for a higher price, or the mixing with lower price juices, and the commercialization of pasteurized or juice from concentrate as fresh squeezed juice [1]. Misrepresentation or substitution of fruit by cheaper species and varieties may be detected by traditional chemical analysis such as high-performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography [2,3]. The use of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy or piezoelectric sensors have been also proposed as analytical tools [4, 5]. DNA-based polymerase chain reaction (PCR) methods are currently used for food species authentication in a wide variety of meat, fish or milk products [6-9], however few reports have shown the usability of these approaches on fruit juice [10-12], and no real-time PCR-based method for the differential



5. Discusión General

Desde las primeras propuestas para el uso de la amplificación específica de DNA mediante PCR en métodos de detección y cuantificación de especies en alimentos (Brodmann and Moor, 2003; Meyer et al., 1994; Wolf and Lüthy, 2001), su aplicación a casos prácticos han revelado una serie de limitaciones y dificultades técnicas que han condicionado su utilización práctica. Mientras que los métodos analíticos para especies extractivas (pescado, molusco, marisco) se han centrado en análisis de secuencia mediante análisis filogenético (FINS) y/o de fragmentos de restricción por RFLP (Puyet and Bautista, 2009), la identificación de especies domésticas, tras algunas propuestas basadas en variantes de métodos de PCR estándar (Janssen et al., 1998; Meyer et al., 1994), desde su primera aplicación para la detección de material bovino en alimentos (Lahiff et al., 2002) se ha decantado por el uso de sistemas qPCR. La simple detección de un material biológico en alimentos mediante análisis de su DNA con PCR plantea, a priori, menos complejidad que su determinación cuantitativa. Por ello, la inmensa mayoría de los métodos propuestos se centran en este tipo de aplicación. Aun así, no todos los inconvenientes asociados a estos métodos se han podido solventar con la suficiente fiabilidad para ser aplicados de forma rutinaria en laboratorios oficiales de análisis.

En este trabajo se han abordado principalmente cuatro aspectos diferentes de la aplicación de sistemas qPCR a la detección y cuantificación de especies en alimentos, con objeto de analizar su potencial y sus limitaciones, y proponer posibles estrategias para mejorar su potencial analítico.

5.1 Optimización de detectores y reducción de costes de ensayo

Uno de los argumentos que pueden cuestionar el uso de qPCR en detección de especies en alimentos es su coste por ensayo, superior en muchos casos a los análisis por inmunodetección. El sistema presentado en el trabajo I de detectores de qPCR se basa en la utilización de sondas fluorescentes en combinación con cebadores específicos para seis especies cárnicas representativas de la industria alimentaria: bovino, porcino, ovino, pollo, pavo y avestruz y dos sondas comunes, una para mamíferos y otra para aves. De este modo el coste por reacción del análisis se reduce significativamente: a precios actuales, el análisis de seis especies con sólo dos sondas específicas frente a una sonda por especie, representaría una reducción del 37% en el coste por reacción. Estrategias similares se han ensayado en otros laboratorios con buenos resultados. Dooley y col. (Dooley et al., 2004) ensayaron un sistema similar basado en cebadores específicos sobre el gen *cytB* de bovino, porcino, ovino, pollo y pavo combinado con dos sondas genéricas, para mamíferos y aves respectivamente. El método permitió detectar las especies en mezclas de carne con un contenido del 0.5% de la especie a detectar, aunque el número de falsos negativos era relativamente alto, llegando en algunos casos al 80%. Posteriormente, este sistema se ha ensayado exclusivamente para la detección de bovino en carnes y productos lácteos, aunque sin demostrar de forma exhaustiva su sensibilidad (Zhang et al., 2007a). Rodríguez

y col. han seguido una aproximación similar para la detección de porcino en productos cárnicos (Rodríguez et al., 2005) o pato en foie gras (Rodríguez et al., 2004), pero utilizando sondas comunes exclusivamente a las especies a analizar, con límites de detección cercanos al 1%.

Otra aproximación que permite simplificar y reducir costes de desarrollo y análisis de forma importante es el uso de qPCR basado en SYBR[®] Green. Los primeros ensayos publicados para detección de bovino, porcino y pollo (Sawyer et al., 2003; Walker et al., 2003) mediante qPCR con SYBR[®] Green no proporcionaron datos sólidos sobre la especificidad y sus límites de detección. Posteriormente, varios métodos diseñados para la detección de bovino, (Martín et al., 2008), caballo (Martín et al., 2009a), porcino (Martín et al., 2009b), rebeco (Fajardo et al., 2008a) y ciervo (Fajardo et al., 2008b), han mostrado la viabilidad de detectar estas especies en productos cárnicos con límites de detección en el entorno del 0.1% al 0.8%. Todos estos métodos utilizan sistemas uniplex, lo que requiere el uso de reacciones separadas para cada juego de cebadores.

La aproximación ensayada en el trabajo II de esta tesis, combinando la detección de fluorescencia de SYBR[®] Green con la obtención de perfiles de desnaturalización de los productos de PCR ha sido, junto al sistema diseñado para la detección de especies de pescado (Trotta et al., 2005), el único ejemplo hasta el momento de un sistema dúplex sobre qPCR con SYBR[®] Green en análisis de especies en alimentos. La identificación de especies en muestras de DNA complejas mediante el método de análisis post-PCR de temperaturas de fusión en dicho trabajo, ha permitido la identificación de las especies de canguro y caballo y su diferenciación de productos tanto bovinos como porcinos logrando unos límites de detección comparables con los conseguidos mediante la combinación de los cebadores específicos con sondas TaqMan[®]. Un posible inconveniente de los métodos basados en SYBR[®] Green es que requieren la verificación de la especificidad del producto amplificado post-PCR mediante electroforesis en geles o curvas de fusión de los productos de PCR. En el trabajo presentado se han conseguido identificar los picos de las curvas de desnaturalización incluso de las mínimas cantidades de DNA detectadas (C_T significativamente distinto de una muestra sin DNA) siendo totalmente equiparable a los resultados obtenidos con sondas fluorescentes TaqMan[®]. Sin embargo, cuando las muestras contienen mezclas de DNA de dos especies y se realizan ambas amplificaciones a la vez, se aprecia una pérdida de sensibilidad en algunas de las mezclas, sobre todo en mezclas concretas como en la de cerdo y canguro. Además, en las condiciones ensayadas, el área bajo los picos observados en las curvas de fusión de las reacciones dúplex no es proporcional a las cantidades relativas de cada especie en la mezcla lo que impide el uso de sistemas múltiplex para aplicaciones en las que sea necesario obtener datos cuantitativos.

A pesar de las ventajas potenciales del uso de sondas semiespecíficas o sistemas SYBR[®] Green para la detección de especies, la necesidad de resolver otros problemas, tales como la detección de DNA en muestras procesadas y la calibración de los métodos

según las distintas matrices, ha hecho que en la mayor parte de los trabajos en los últimos años se utilicen sistemas de cebador y/o sonda específicos de especie ya que a pesar de su mayor coste pueden plantear menos inconvenientes desde el punto de vista de la especificidad.

5.2 Uso de materiales de referencia para normalización de resultados

La detección de materiales en alimentos mediante qPCR adolece de un problema de base fundamental: la falta de correlación entre el contenido en DNA y la cantidad real de material de esa especie en la muestra. Esta discrepancia puede tener, a su vez, dos orígenes: las diferencias de contenido en DNA en tejidos tan distintos como el conectivo, la carne grasa o la magra, que contienen concentraciones de DNA variables, lo que ocasiona que el peso de la carne no se correlacione exactamente con los porcentajes de DNA específico de especie, y la posible fragmentación de las cadenas de DNA debidas al procesamiento de los productos, sobre todo por tratamientos térmicos. Esta falta de correlación afecta no sólo a los ensayos cuantitativos, sino también a los cualitativos, ya que los límites de detección, y por tanto los criterios para dar una muestra como positiva o negativa en un ensayo pueden ser diferentes dependiendo de la cantidad de DNA detectable por unidad de masa del tejido analizado.

El uso de cebadores universales o sondas no específicas de especie proporcionan una medida del DNA total presente en la muestra o control de PCR externo. Esta medida se hace imprescindible para discernir si las variaciones encontradas con los cebadores específicos de especie son debidas al contenido de DNA de la especie analizada o a otros factores como degradación del DNA, inhibición o a diferencias en la cantidad de DNA total de la reacción de PCR. La comparación entre las medidas de los cebadores específicos de especie frente a los universales, permite realizar una normalización que minimiza posibles inexactitudes. En teoría, la relación entre la señal producida con cebadores específicos de especie y cebadores universales debería ser constante para cualquier muestra independientemente de la concentración, del estado de degradación o de inhibidores del PCR, porque la amplificación en ambas reacciones estaría afectada por los mismos factores. Sin embargo, se ha encontrado que esto no ocurre necesariamente así en la práctica. Por ejemplo, cuando se varía la concentración de la muestra, la respuesta de amplificación registrada no es constante para las reacciones con cebadores específicos de especie y universales (Sawyer et al., 2003). Para intentar solucionar estos problemas, en distintos trabajos se han propuesto métodos analíticos que permitirían evitar la aparición de falsos negativos y/o calibrar los datos cuantitativos.

Laube y col. en una serie de trabajos (Laube et al., 2003; Laube et al., 2007a; Laube et al., 2007b) utilizaron por primera vez una sonda semiespecífica basada en el gen miostatina que hibrida con una variedad de especies de mamíferos y aves como control positivo en un ensayo para bovino y porcino. Otros trabajos han utilizado sondas genéricas para

mamíferos sobre los genes rRNA 12S mitocondrial (Rodríguez et al., 2005); o 18S nuclear (Fajardo et al., 2008a; Fajardo et al., 2009; Fajardo et al., 2008b; Martin et al., 2008; Pegels et al., 2011). El gen nuclear del RNA ribosómico 18S presenta la doble ventaja de estar asociado a una menor tasa mutacional que los mitocondriales, lo permite el diseño de los cebadores y sonda del PCR en regiones conservadas para multitud de especies, y encontrarse en varias copias a pesar de ser un gen nuclear, lo que aumenta la sensibilidad para su detección. En todos los casos estos detectores se usaron como controles positivos para comprobar la presencia de DNA amplificable en la muestra. Utilizar este tipo de detectores universales para normalizar los resultados es, sin embargo, más complejo. En el sistema de detección propuesto por Rodríguez y col. para la detección de pato en foie gras (Rodríguez et al., 2004) se utilizó un detector común oca+pató como control de la amplificación. Este sistema es exclusivo para la matriz analizada, pero puede extenderse a otros materiales si se conocen a priori las especies que se puedan encontrar. En el trabajo I de esta tesis se propone por primera vez un sistema para obtener una estimación de la cantidad de DNA amplificable en la muestra, utilizando el gen rRNA 18S como referencia, y compararlo con la cantidad de DNA detectada para cada especie analizada. Este sistema supone el avance de permitir verificar de forma cuantitativa si existe DNA en la muestra distinto del identificado por los detectores específicos, cubriendo una mayor diversidad de posibles especies. En la aplicación descrita en el trabajo I, el uso de la región conservada de la secuencia del 18S ribosomal sirve para tres propósitos: *i.* proporciona un control positivo del DNA eucariótico total presente en la muestra; *ii.* permite averiguar si hay DNA en la muestra de otras especies no detectadas por detectores específicos de especie con la restricción de que la capacidad de detección del contenido de DNA no identificado ha de ser superior al 20% sobre el DNA eucariótico total de la muestra, necesario para que existan diferencias significativas entre $C_{c,th}$ y C_c , y *iii.* permite obtener datos cuantitativos de diferentes especies, permitiendo el cálculo de los porcentajes en la mezcla lo que es particularmente útil para la verificación del etiquetado de productos alimenticios donde sólo vienen indicados los porcentajes de los principales ingredientes. El método presentado supera el inconveniente de la variabilidad en el número de copias en los genes del rRNA entre especies comparando los resultados experimentales con una curva estándar teórica calculada a partir de los parámetros de regresión lineal de las especies analizadas. En trabajos posteriores realizados con el sistema de SYBR[®] Green, se utilizó un detector similar para el gen 18S de eucariotas para obtener datos normalizados de cuantificación de porcino en piensos (Martín et al., 2009b).

No obstante, el uso de detectores universales para la normalización de las medidas de qPCR en análisis de alimentos se ha visto en los últimos años desplazada por métodos que proponen utilizar materiales de referencia específicos para cada ensayo, sobre todo para el análisis de alimentos procesados, donde la fragmentación del DNA y la presencia de inhibidores de la amplificación puede alterar los resultados. Aunque en varios trabajos iniciales se analizaron con éxito muestras procesadas (Laube et al., 2003; Rodríguez et al.,

2004; Rodríguez et al., 2005), el efecto del calor y la presión en la fragmentación del DNA y su efecto en los sistemas de qPCR (Hird et al., 2006) han dado lugar a diferentes estrategias para reducir estos efectos negativos en la calidad de los resultados. El uso de detectores muy cortos permitiría en principio amplificar DNA muy fragmentado. Se han utilizado con éxito detectores de 68 pb (incluyendo una sonda TaqMan[®] de 24 pb) para detectar bovino y porcino en subproductos animales muy procesados y piensos (Fumiere et al., 2006), o bovino y porcino, con amplicones de 84 pb y 75 pb respectivamente, en sistemas basados en SYBR[®] Green (Martin et al., 2008; Martín et al., 2009b). En el trabajo III de esta tesis se ha ensayado el método de detección basado en detectores que emplean sondas TaqMan[®] MGB para productos procesados. El uso de sondas MGB permite reducir la longitud del detector, ya que éstas mantienen su unión específica con aproximadamente, longitudes de oligonucleótido que son la mitad de una sonda TaqMan[®] estándar. El efecto del tratamiento térmico sobre el DNA se comparó con los resultados obtenidos tras la hidrólisis controlada del DNA con el enzima DNasa I, demostrando la viabilidad de dicho método para detectar fragmentación en el DNA, puesto que las muestras de carne tratadas con calor mostraron diferentes grados de fragmentación correspondiendo con la intensidad del tratamiento. Estos resultados permitieron validar los datos obtenidos de los análisis cuantitativos basados en PCR en tiempo real, puesto que el tamaño de los amplicones usados para cuantificar es adecuado para el grado de fragmentación del DNA presente en las muestras.

Dada la dificultad de obtener datos cuantitativos reproducibles, la tendencia actual se dirige al uso de materiales de referencia adecuados para calibración del ensayo. Estos materiales deben asemejarse en la medida de lo posible a las muestras a analizar, tanto en composición como en tratamiento. Por lo tanto es necesario conocer con antelación el tipo de tejidos y tratamiento utilizado en la fabricación del producto para elaborar los correspondientes materiales de referencia adaptados a esa matriz (Eugster et al., 2009; Köppel et al., 2008).

Del estudio realizado por Köppel y col. (Köppel et al., 2008), en el que se comparan los resultados cuantitativos obtenidos con rectas patrón construidas a base de diluciones de DNA respecto a los obtenidos con rectas patrón construidas a partir de DNA extraído de matrices realizadas con el material de referencia adaptado al ensayo, se desprende que los métodos basados en rectas patrón de diluciones de DNA no son fiables para la cuantificación de muestras relativamente procesadas como puedan ser, por ejemplo, la salchichas. Esto se debe a que la estrategia de calibración con diluciones de DNA no tiene en cuenta las diferencias que tienen los distintos tejidos en contenido de DNA. Con el método de calibración realizado con DNA extraído de matrices fabricadas con el material de referencia, se obtuvieron resultados más exactos y precisos, incluso en reacciones múltiple de cuatro especies (Köppel et al., 2009). Sin embargo, este método requiere la elaboración de materiales de referencia específicos para cada tipo de ensayo. Por ejemplo, el uso de los

materiales de referencia elaborados para la detección de porcino en salchicha no sería válido para la detección de porcino en patés.

Conforme a esta idea, en el trabajo III de esta tesis los detectores para bovino y porcino desarrollados anteriormente en el trabajo I se ensayaron sobre muestras frescas, cocinadas y esterilizadas de mezclas de carnes de vaca y cerdo. A diferencia del procedimiento propuesto por Köppel, en el que se elaboraron muestras de referencia para toda la gama de proporción de porcino y bovino en salchicha, en nuestro caso utilizamos tan sólo los valores de referencia obtenidos de la preparación de una muestra de referencia con un contenido 50:50 de vaca y cerdo para calibrar los C_T . De esta forma se reduce de forma importante el número de muestras de referencia a elaborar, simplificando el ensayo. Una de las ventajas de este método es que permite obtener un valor realista de la diferencia en el número de copias de la secuencia diana por unidad de masa del material empleado para cada especie, lo que permite normalizar de forma muy sencilla los datos obtenidos mediante qPCR a proporciones de material de cada especie en las muestras. Igualmente, se muestra que este tipo de materiales de referencia son adecuados para el análisis de alimentos procesados, ya que se pueden someter al mismo tipo de tratamiento que las muestras a ensayar. Un método similar se empleó en el trabajo IV de esta tesis, en el que una muestra de referencia con un contenido en mandarina:naranja 50:50 permite analizar el contenido de estas especies en zumos.

5.3 Diferenciación entre especies filogenéticamente próximas

La capacidad de discriminación del qPCR para polimorfismos SNP se usa de forma extensiva en el análisis de enfermedades genéticas. Esta propiedad puede utilizarse también en el análisis de especies en alimentos en el caso de especies muy próximas filogenéticamente o variedades dentro de una misma especie, entre las que las diferencias de secuencia pueden limitarse a unos pocos SNP repartidos por el genoma. Esta posibilidad, que no se había probado anteriormente en alimentos, se ensayó en el trabajo IV de esta tesis para el caso de la diferenciación de naranja y mandarina en zumos. Este método de detección/cuantificación, basado en la utilización de un juego de cebadores comunes para las dos especies y dos sondas TaqMan[®] MGB que se diferencian en una sola base, es viable dentro de los límites generalmente aceptados para diferenciar entre ingrediente y contaminación, si bien es necesario que el procedimiento de análisis vaya acompañado de suficientes reacciones de control con materiales de referencia, para evitar errores de cuantificación debido a la variabilidad asociada a las medidas. Estos controles pueden elaborarse a partir de mezclas con cantidades conocidas de zumo de cada especie tal como se indica en el apartado anterior. El método desarrollado permite detectar a partir del 5% (límite de detección) de mandarina en zumo de naranja y cuantificar el contenido en mandarina, con una incertidumbre del 20% en el rango de 0 a 10% de mandarina en naranja, siendo válido tanto para zumos directos como obtenidos de concentrados. El trabajo supone una innovación frente a otros publicados anteriormente, ya que todos los

métodos descritos para el análisis de cítricos se basan en otras metodologías. Este método debe, sin embargo, ser ensayado y perfeccionado en el futuro incluyendo en la validación otros cítricos, como el pomelo, lima, limón, etc., así como extendiendo el número de variedades e híbridos analizados dentro de cada especie. Durante la elaboración de esta tesis, un método similar de detección de mandarina en zumos, utilizando otros polimorfismos de secuencia del DNA de cloroplasto, ha sido publicado en una patente de la Fundación Azti, Vizcaya (López de Gamboa and Pardo González, 2011). La dificultad de encontrar polimorfismos adecuados para una variedad muy extensa de cítricos podría abordarse realizando un análisis múltiple con varios juegos de detectores que, en combinación, generen un patrón de señal característico para cada especie.

Este tipo de detección de polimorfismos mediante qPCR podría aplicarse a otros materiales de alto valor, como el caso de las distintas variedades de cerdo, para las que se han identificado un gran número de SNPs (Rohrer et al., 2007), y en particular para la identificación de cerdo ibérico en alimentos, para el que algunos marcadores mitocondriales ya identificados (Alves et al., 2009) podrían ser aplicados a técnicas de detección mediante qPCR.

5.4 Detección frente a cuantificación

Debido a las restricciones que supone la variedad de matrices y tratamientos posibles en la composición de los alimentos procesados, la cuantificación efectiva de las especies presentes mediante qPCR no se ha desarrollado en la misma medida que en otras aplicaciones tales como la evaluación de la expresión génica. Mientras que en las aplicaciones de expresión génica se utiliza el RNA mensajero de un gen referencia para estandarizar el nivel de transcripción del gen estudiado y en la cuantificación de DNA transgénico en mezclas de DNA transgénico/silvestre se usan secuencias consenso específicas de especie para la estandarización y el control de la reacción de PCR (Permingeat et al., 2002), la falta de secuencias diana que puedan utilizarse para calibrar los datos cuantitativos entre distintas especies dificulta el establecimiento de ensayos robustos de cuantificación. En cuanto a las muestras alimenticias, la gran variabilidad existente en estas muestras por la presencia de distintos tejidos y tipos de especie, el número de copias del DNA diana por unidad de masa de tejido y la fragmentación que haya sufrido el DNA en el procesamiento, hace que el análisis cuantitativo sea particularmente complejo. Cuando están presentes en la muestra varias especies, en muchos casos de origen desconocido, el cálculo de las cantidades relativas de cada especie en la mezcla es particularmente difícil. La razón es que debería encontrarse una única secuencia consenso de referencia que estuviera presente en todas las posibles especies, con un número conocido de copias por unidad de masa en cada una de las especies.

Los primeros ensayos en los que se evaluaron datos cuantitativos de análisis por qPCR de muestras de alimentos utilizaban métodos relativamente laboriosos que requerían el cálculo del número de copias de cada DNA diana, calibrando con el tamaño del genoma de

cada especie o de fragmentos clonados en plásmidos (Laube et al., 2007a). Aunque los resultados eran correctos, este tipo de aproximación no ha tenido continuidad. Posteriormente, un ensayo interlaboratorio realizado con diferentes métodos de PCR sobre muestras problema de salchicha con distintos contenidos de cerdo y ternera, utilizando materiales de referencia comunes adaptados a la matriz (Eugster et al., 2008), demostró que era posible realizar medidas cuantitativas con gran precisión (desviación estándar relativa <12%) si el material a analizar era similar en composición y tratamiento al de referencia. Este método se amplió posteriormente a otras especies en sistemas múltiplex (Köppel et al., 2012; Köppel et al., 2008; Köppel et al., 2009).

En el trabajo I de esta tesis, se abordó la posibilidad de utilizar el gen rRNA 18S para normalizar los C_T obtenidos con los detectores específicos de cada especie. Aunque los resultados fueron aceptables para mezclas de DNA, su aplicación posterior en el trabajo III para normalizar los datos obtenidos a partir de DNA extraído de mezclas de carne procesadas, dio lugar a imprecisiones de medida (resultados no mostrados). Esta imprecisión en las medidas cuantitativas se debía con toda probabilidad a las diferencias en el número de copias por unidad de masa entre las dos especies, tanto de los detectores específicos como del gen rRNA18S. Esto llevó a prescindir del uso del gen 18S y utilizar en su lugar las muestras de referencia adaptadas a la matriz con una proporción 1:1 de cada especie. De esta forma se consiguen cuantificar contenidos de una de las especies entre el 5 y el 10%, con una exactitud del 80%. Porcentajes menores del 5%, se detectan pero no se consigue una cuantificación precisa. Aun así, el método puede ayudar a diferenciar entre una contaminación admisible y la presencia intencionada de la especie en la mezcla.

Los resultados obtenidos en esta tesis tanto para mezclas de ternera/cerdo (trabajo III) como para mandarina/naranja (trabajo IV) muestran que, hasta el momento, los métodos basados en el uso de materiales de referencia adaptados a la matriz permiten un cálculo de las proporciones de las especies en los alimentos razonablemente preciso y sencillo, con el inconveniente de requerir la elaboración de estos materiales de referencia de forma individualizada para cada tipo de alimento a analizar.

La evolución de las necesidades de la industria alimentaria y de los organismos encargados del control de calidad apunta, tal como se sugiere en el trabajo IV, a unos sistemas de análisis más simplificados, en los que la cuantificación de los materiales presentes en la composición de un producto no sería tan necesaria como la detección fiable de esos materiales con unos límites de detección bien establecidos. Desde el punto de vista de diferenciar entre un material que se ha añadido como ingrediente, una posible contaminación procedente del proceso de fabricación, o el aseguramiento de la ausencia de determinados materiales, basta con establecer unos valores adecuados que marquen el límite entre presencia y ausencia del material. Una vez establecido este límite, los sistemas de qPCR se pueden diseñar y validar para comprobar que sus límites de detección se encuentren por debajo de esos valores. Para ello se hace necesario disponer de

información sobre el método de fabricación que permita elaborar las adecuadas muestras de referencia adaptados a la matriz. Por el contrario, el diseño de detectores y condiciones de amplificación no se verían afectadas por el tipo de muestra a analizar. Un único detector para bovino puede ser adecuado para múltiples matrices, de forma que la aplicación a distintos productos sólo requeriría realizar parte de la validación con cada uno de ellos. Los resultados de los trabajos de esta tesis apuntan a que dicha validación se puede realizar con un número muy pequeño de muestras de referencia, por ejemplo mezclas 1:1 cuando se analizan dos especies. Esta simplificación compensaría en parte la dificultad de elaborar y ensayar materiales de referencia específicos para cada tipo de producto.



6. Conclusiones

Trabajos I y III

- 1- La combinación de cebadores específicos de especie y sondas genéricas específicas de mamífero y ave permiten la detección y cuantificación de vaca, cerdo, cordero, pollo, pavo y avestruz en mezclas de DNA, permitiendo el desarrollo de métodos más económicos y sencillos que los basados en sondas específicas de especie.
- 2- El uso de detectores para grupos amplios de especies, como el diseñado sobre el gen rRNA 18S, permite comprobar la presencia de DNA de otras especies en la muestra y funcionan como controles positivos internos. La detección de DNA eucariótico de especies no analizadas mediante el método basado en el cálculo del $C_{c,th}/C_c$, se logra cuando éstas se encuentran en porcentajes mayores del 20%.
- 3- Los detectores diseñados para bovino y porcino permiten la amplificación de DNA en muestras procesadas, logrando detectar el 5% de porcino en materiales mezcla de ambos, cocinados a 65°C y posteriormente esterilizados a 126°C durante 30 minutos.
- 4- La amplificación de fragmentos de distinto tamaño obtenidos mediante digestión con DNasa I permite correlacionar el grado de fragmentación del DNA con los resultados de qPCR. Mediante esta aproximación, se ha podido determinar que el tratamiento térmico a 126°C durante 10 minutos produce fragmentos de DNA de longitud media inferior a 200pb.
- 5- Las medidas cuantitativas extrapoladas a la cantidad de carne presente en la mezcla son fiables en el caso de las muestras no procesadas: correlación entre el dato real y el experimental entre 0.96 y 0.99 ($p < 0.05$).
- 6- En el caso de mezclas procesadas, la sensibilidad para la detección desciende hasta el 5% en vaca y pollo, y el 50% en cerdo y pavo. La correlación en los datos cuantitativos se pierde con las muestras procesadas (< 0.94).

Trabajo II:

- 1- El sistema de amplificación de qPCR adaptado al uso de SYBR[®] Green permite la identificación de DNA de cuatro especies cárnicas en estudio, con unos límites de detección similares a los obtenidos con sistemas basados en sondas oligonucleotídicas fluorescentes.
- 2- El análisis de los productos de reacción del sistema SYBR[®] Green a través de su curva de desnaturalización logra la detección simultánea de dos especies en sistemas dúplex, aunque su sensibilidad se ve reducida. Este efecto es dependiente de las parejas de detectores y DNA que se encuentren en la reacción.
- 3- El sistema SYBR[®] Green permite la detección de las cuatro especies (ternera, cerdo, pollo y pavo) en mezclas de carne no procesadas, con una sensibilidad del 1 %.

Trabajos III y IV:

- 1- Todas las variedades de mandarina y naranja analizadas presentan un polimorfismo en el nucleótido 51542 de la región intergénica tnrL-tnrF que permite identificar las dos especies.
- 2- Un sistema dúplex de detección del polimorfismo identificado mediante sondas TaqMan[®] MGB permite la detección de mandarina en zumos de naranja con un límite del 5%, independientemente de que el zumo proceda de concentrado.
- 3- La relación en número de copias de la secuencia diana tnrL-tnrF entre mandarina y naranja se pudo establecer mediante qPCR en 2.6 veces. Esta diferencia afecta a las medidas experimentales para el cálculo de las proporciones de ambos productos en zumos.
- 4- La comparación de los C_T obtenidos a partir de muestras de referencia adaptadas a la matriz que contienen una mezcla conocida de las dos especies a analizar, tanto en el caso de las mezclas de carnes procesadas como en el de zumos, permite corregir las desviaciones debidas a las diferencias en número de copias de las secuencias diana por unidad de masa de material de cada especie presente, lo que permite obtener datos fiables de la composición del producto.
- 5- El uso de materiales de referencia adaptados a la matriz se presenta como la opción más adecuada para el desarrollo de métodos de análisis mediante qPCR de especies y variedades presentes en productos alimenticios.



7. Bibliografía

- Abravaya, K., Huff, J., Marshall, R., Merchant, B., Mullen, C., Schneider, G., and Robinson, J. (2003). Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin Chem Lab Med* **41**, 468-474.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., and Meyer, R.B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucl Acids Res* **25**, 2657-2660.
- Alishahi, A., Farahmand, H., Prieto, N., and Cozzolino, D. (2010). Identification of transgenic foods using NIR spectroscopy: A review. *Spectrochim Acta A* **75**, 1-7.
- Alves, E., Fernandez, A.I., Fernandez-Rodriguez, A., Perez-Montarelo, D., Benitez, R., Ovilo, C., Rodriguez, C., and Sillio, L. (2009). Identification of mitochondrial markers for genetic traceability of European wild boars and Iberian and Duroc pigs. *Animal* **3**, 1216-1223.
- Asensio, L., Gonzalez, I., Fernandez, A., Rodriguez, M.A., Lobo, E., Hernandez, P.E., Garcia, T., and Martin, R. (2002). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *J Food Protect* **65**, 432-435.
- Ayaz, Y., Ayaz, N.D., and Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay *J Muscle Foods* **17**, 214-220.
- Ayyadevara, S., Thaden, J.J., and Shmookler Reis, R.J. (2000). Discrimination of Primer 3'-Nucleotide Mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* **284**, 11-18.
- Bajla, I., Holländer, I., Fluch, S., Burg, K., and Kollár, M. (2005). An alternative method for electrophoretic gel image analysis in the GelMaster software. *Comput Meth Prog Bio* **77**, 209-231.
- Barcode of Life. <http://www.barcodeoflife.org/>
- Bartlett, S.E., and Davidson, W.S. (1992). FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): A procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Biotechniques* **12**, 408-411.
- Bektas, Y., and Belduz, A.O. (2007). Molecular characterization of the whiting (*Merlangius merlangus euxinus nordmann*, 1840) in Turkish Black Sea coast by RAPD analysis. *J Anim Vet Adv* **6**, 739-744.
- Benedetto, A., Abete, M.C., and Squadrone, S. (2011). Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs. *Food Chem* **126**, 1436-1442.
- Berger, R.G., Mageau, R.P., Schwab, B., and Johnston, R.W. (1988). Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Assoc Off Ana Chem* **71**, 406-409.
- Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V., and Secchi, C. (2006). Identification of freshwater fish commercially labelled "perch" by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *Food Chem* **96**, 163-168.
- BioMérieux. Food Expert ID: The identity Card. http://www.gene-express.de/content/C4_en.html
- Bjerrum, O.J. (1975). Quantitative immunoelectrophoresis for comparative analysis of membrane proteins from various mammalian species. *Int J Biochem* **6**, 513-514, IN519-IN514, 515-519.

- Boletín Oficial del Estado (1999). Real Decreto 1334/1999, de 31 de Julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. *24.08.1999*, Vol **202** pp. 31402-31418.
- Boletín Oficial del Estado (2004). Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. *27.11.2004*, Vol **286** pp. 39355-39357.
- Bradley, R. (2003). BSE risks for humans consuming beef and beef products: How any risks are managed. *Vet Res Comm* **27**, 15-23.
- Brodmann, P.D., and Moor, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci* **65**, 599-607.
- Brown, W.M., George, M., Jr., and Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* **76**, 1967-1971.
- Buchgraber, M., Ulberth, F., and Anklam, E. (2000). Comparison of HPLC and GLC Techniques for the Determination of the Triglyceride Profile of Cocoa Butter. *J Agric Food Chem* **48**, 3359-3363.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**, 597-601.
- Cammarato, A., Craig, R., and Lehman, W. (2010). Electron microscopy and three-dimensional reconstruction of native thin filaments reveal species-specific differences in regulatory strand densities. *Biochem Biophys Res Com* **391**, 193-197.
- Campos, E.T., Espinosa, M.A.G., Warburton, M.L., Varela, A.S., and Monter, A.V. (2005). Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. *Interciencia* **30**, 687-693.
- Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Fernández, A., Asensio, L.M., Hernández, P.E., and Martín, R. (2000). Identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene. *J AOAC Int* **83**, 341346.
- Carrera, M., Canas, B., Pineiro, C., Vazquez, J., and Gallardo, J.M. (2006). Identification of commercial hake and grenadier species by proteomic analysis of the parvalbumin fraction. *Proteomics* **6**, 5278-5287.
- Cattori, V., and Hofmann-Lehmann, R. (2008). Absolute quantitation of feline leukemia virus proviral DNA and viral RNA loads by TaqMan real-time PCR and RT-PCR. *Methods Mol Biol* **429**, 73-87.
- Clegg, R.M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotech* **6**, 103-110.
- Congiu, L., Fontana, F., Patarnello, T., Rossi, R., and Zane, L. (2002). The use of AFLP in sturgeon identification. *J Appl Ichthyol* **18**, 286-289.
- Cunningham, E.P., and Meghen, C.M. (2001). Biological identification systems: genetic markers. *Rev Sci Tech OIE* **20**, 491-499.
- Cushwa, W.T., and Medrano, J.F. (1996). Applications of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Anim Biotechnol* **7**, 11-31.
- Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W., and Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Sci* **70**, 727-732.

- Dalmaso, A., Civera, T., La Neve, F., and Bottero, M.T. (2011). Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chem* **124**, 362-366.
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., and Bottero, M.T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes* **18**, 81-87.
- Dalvit, C., De Marchi, M., and Cassandro, M. (2007). Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Sci* **77**, 437-449.
- Delwiche, S.R., Pordesimo, L.O., Scaboo, A.M., and Pantalone, V.R. (2006). Measurement of Inorganic Phosphorus in Soybeans with Near-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem* **54**, 6951-6956.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., and Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* **354**, 34-39.
- Di Pinto, A., Alfano, F., Giordano, A., Capuano, F., Valentina, T., and Tantillo, G. (2008). Quantitative real-time polymerase chain reaction for the presence of genetically-modified maize in breaded "ready-to-cook" food products. *Food Control* **19**, 1002-1005.
- Dooley, J.J., Paine, K.E., Garret, S.D., and Brown, H.M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci* **68**, 431-438.
- Eckert, K.A., and Kunkel, T.A. (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl Acids Res* **18**, 3739-3744.
- Edwards, M.C., and Gibbs, R.A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* **3**, S65-75.
- Elisa Technologies. Elisa Technologies\Diagnostic testing kits\Species identification. <http://www.elisa-tek.com/diagnostic-testing-kits/species-identification/>
- Enger, O. (1996). Use of the fluorescent dye PicoGreen for quantification of PCR products after agarose gel electrophoresis. *Biotechniques* **21**, 372-374.
- Eppendorf Array Technologies. DualChip GMO Kit. <http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=251&action=products&contentid=176>
- Esturo, A. (2008). Results EQCS orange juice campaign 2007. In European Quality Control System for Juices and Nectars from Fruits and Vegetables Workshop (Frankfurt, Germany).
- Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Rehbein, H., Kundiger, R., Mendes, R., Costa, H., Perez-Martin, R., Pineiro-Gonzalez, C., Craig, A., *et al.* (2000). Identification of fish species after cooking by SDS-PAGE and urea IEF: A collaborative study. *J Agric Food Chem* **48**, 2653-2658.
- Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., Hubner, P., and Koppel, R. (2008). Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol* **227**, 17-20.
- Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., and Koppel, R. (2009). Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol* **230**, 55-61.
- Eurofins Scientific. Eurofins\Food & Feed Testing\Authenticity. <http://www.eurofins.com/en.aspx>
- European Commission (2002). Commission decision of 27 March 2002 amending council decision 2007/766/EC and commission decision 2001/9/EC with regard to

- transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal proteins. 2002/248/EC, *Official Journal of the European Communities*, Vol **L84** pp. 71-72.
- European Commission (2004). Commission Recommendation of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. 2004/787/EC, *Official Journal of the European Union*, 24.11.2004, Vol **L348** pp. 18-26.
- European Council (2000). Directive of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. 2000/13/EC *Official Journal of the European Communities*, 06.05.2000, Vol **L109** pp. 29-42.
- European Council (2002). Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. 178/2002 *Official Journal of the European Communities*, 01.02.2002, Vol **L31** pp. 1-24.
- Fajardo, V., Gonzalez, I., Martin, I., Rojas, M., Hernandez, P.E., Garcia, T., and Martin, R. (2008a). Real-time PCR for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. *J AOAC Int* **91**, 103-111.
- Fajardo, V., Gonzalez, I., Martin, I., Rojas, M., Hernandez, P.E., Garcia, T., and Martin, R. (2009). A LightCycler TaqMan PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in experimental meat mixtures. *Int J Food Sci Technol* **44**, 1997-2004.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., and Martín, R. (2008b). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Sci* **79**, 289-298.
- Ferre, F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl* **2**, 1-9.
- Fishbol. Fishbol Project. www.fishbol.org
- Fishpoptrace. The Structure of Fish Populations and Traceability of Fish and Fish Products. <https://fishpoptrace.jrc.ec.europa.eu/>
- Fishtrace. Genetic catalogue, Biological Reference Collections and Online Database of European Marine Fishes. <http://www.fishtrace.org/>
- Flores-Munguia, M.E., Bermudez-Almada, M.C., and Vazquez-Moreno, L. (2000). A research note: Detection of adulteration in processed traditional meat products. *J Muscle Foods* **11**, 319-325.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., von-Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., Bove, D., Battaglia, P.A., Agrimi, U., Brambilla, G., *et al.* (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J Food Protect* **66**, 103-109.
- Frezza, D., Giambra, V., Chegiani, F., Fontana, C., Maccabiani, G., Losio, N., Faggionato, E., Chiappini, B., Vaccari, G., von Holst, C., *et al.* (2008). Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innov Food Sci Emerg* **9**, 18-23.
- Fumiere, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C., and Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem* **385**, 1045-1054.

- Ganopoulos, I., Argiriou, A., and Tsaftaris, A. (2011). Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* **22**, 532-541.
- García-Segura, J.M., Gavilanes, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez-Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., and Vivanco, F. (1996). *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*. Madrid, Editorial Síntesis.
- García, T., Martín, R., Rodríguez, E., Hernández, P.E., and Sanz, B. (1989). Development of a cows' milk identification test (COMIT) for field use. *J Dairy Res* **56**, 691-698.
- Gasparic, M.B., Tengs, T., La Paz, J.L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Zel, J., and Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem* **396**, 2023-2029.
- Gayo, J., and Hale, S.A. (2007). Detection and quantification of species authenticity and adulteration in crabmeat using visible and near-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem* **55**, 585-592.
- Ghovvati, S., Nassiri, M.R., Mirhoseini, S.Z., Moussavi, A.H., and Javadmanesh, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* **20**, 696-699.
- Gongora, J., Fleming, P., Spencer, P.B.S., Mason, R., Garkavenko, O., Meyer, J.-N., Droegemueller, C., Lee, J.H., and Moran, C. (2004). Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear GPII genotype. *Mol Phylogenet Evol* **33**, 339-348.
- González, E.G., Krey, G., Espineira, M., Diez, A., Puyet, A., and Bautista, J.M. (2010). Population proteomics of the European Hake (*Merluccius merluccius*). *J Proteom Res* **9**, 6392-6404.
- González, I., Carrera, E., Fernández, A., Hernández, P.E., García, M.T., Martín, R., Asensio, L., and Céspedes, A. (2000). Identificación de salmón, trucha y palometa ahumados: técnicas analíticas de interés. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **5**, 123-136.
- Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R.F., and Smith, L.M. (1994). Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucl Acids Res* **22**, 5456-5465.
- Hacisalihoglu, G., Larbi, B., and Settles, A.M. (2009). Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Predicts Protein, Starch, and Seed Weight in Intact Seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* **58**, 702-706.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* **1**, 55-63.
- Hall, T.S., Pancoska, P., Riccelli, P.V., Mandell, K., and Benight, A.S. (2001). Sequence context and thermodynamic stability of a single base pair mismatch in short deoxyoligonucleotide duplexes. *J Am Chem Soc* **123**, 11811-11812.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 968-994.
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., and Pla, M. (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal Biochem* **323**, 164-170.
- Herrero, B., Madriñan, M., Vieites, J.M., and Espiñeira, M. (2010). Authentication of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Using Real Time PCR. *J Agric Food Chem* **58**, 4794-4799.

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring DNA amplification reactions. *Biotechnol* **11**, 1026-1030.
- Hird, H., Chisholm, J., Sanchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., and Popping, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam* **23**, 645-650.
- Hird, H.J., Hold, G.L., Chisholm, J., Reece, P., Russell, V.J., Brown, J., Goodier, R., and MacArthur, R. (2005). Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. *Eur Food Res Technol* **220**, 633-637.
- Hitchcock, C.H.S., and Crimes, A.A. (1985). Methods for Meat and Species Identification. *Meat Sci* **15**, 215-224.
- Hofmann, K. (1997). Safe controls for renewed confidence: the ELISA meat & bone meal test. *Fleischerei* **11**, III-VI.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and 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* **88**, 7276-7280.
- Hsieh, Y.H.P., Woodward, B.B., and Ho, S.H. (1995). Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *J Food Protect* **58**, 555-559.
- Huby-Chilton, F., Murphy, J., Chilton, N.B., Gajadhar, A.A., and Blais, B.W. (2010). Detection of Prohibited Animal Products in Livestock Feeds by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *J Food Protect* **73**, 119-124.
- Innis, M., Gelfand, D., Michael, A.I., David, H.G., and John, J.S. (1999). Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. In *PCR Applications* San Diego, Academic Press, pp. 3-22.
- Janssen, F.W., Hagele, G.H., Buntjer, J., and Lenstra, J.A. (1998). Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **21**, 115-120.
- Jemmi, T., and Schlosser, H. (1991). Animal species determination in heat-treated meat from domestic and wild ruminants using isoelectric-focusing. *Fleischwirtschaft* **71**, 1191-&.
- Jemmi, T., and Schlosser, H. (1993). SPECIES IDENTIFICATIONS IN MARINATED AND HEAT-TREATED MEAT USING ISOELECTRIC-FOCUSING. *Fleischwirtschaft* **73**, 600-602.
- Jerome, M., Lemaire, C., Verrez-Bagnis, W., and Etienne, M. (2003). Direct sequencing method for Species identification: fish of canned sardine and sardine-type products. *J Agric Food Chem* **51**, 7326-7332.
- Jonker, K.M., Tilburg, J., Hagele, G.H., and De Boer, E. (2008). Species identification: fish in meat products using real-time PCR. *Food Addit Contam* **25**, 527-533.
- Josefsen, M.H., Löfström, C., Sommer, H.M., and Hoorfar, J. (2009). Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries. *Mol Cell Probes* **23**, 201-203.
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., and Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci* **82**, 444-449.
- Kim, W., Kim, S., Choi, H., Truong, N.D., Thong, L.M., Kim, J.H., Xiao, R., Park, K.K., Seo, K., Lee, H., *et al.* (2010). Discrimination of Animal Species Using Polymorphisms of the Nuclear Gene Zinc Finger Protein 238. *J Agric Food Chem* **58**, 2398-2402.
- Kingcombe, C.I.B., Luthi, E., Schlosser, H., Howald, D., Kuhn, M., and Jemmi, T. (2001). A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions fo

- animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci* **57**, 35-41.
- Knight, A.I. (1998). Method for detecting a particular plant in a product. Patent N. WO/1998/014607.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., and Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 6196-6200.
- Kocher, T.D., and Wilson, A.C. (1991). DNA amplification by the polymerase chain reaction. In *Essential Molecular Biology vol2*, T.A. Brown, ed., Oxford University Press, pp. 187-209.
- Kochzius, M., Nolte, M., Weber, H., Silkenbeumer, N., Hjorleifsdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Marteinson, V., Kappel, K., Planes, S., Tinti, F., et al. (2008). DNA microarrays for identifying fishes. *Mar Biotechnol* **10**, 207-217.
- Köppel, R., Eugster, A., Ruf, J., and Rentsch, J. (2012). Quantification of Meat Proportions by Measuring DNA Contents in Raw and Boiled Sausages Using Matrix-Adapted Calibrators and Multiplex Real-Time PCR. *J AOAC Int* **95**, 494-499.
- Köppel, R., Ruf, J., and Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *Eur Food Res Technol* **232**, 151-155.
- Köppel, R., Ruf, J., Zimmerli, F., and Breitenmoser, A. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. *Eur Food Res Technol* **227**, 1199-1203.
- Köppel, R., Zimmerli, F., and Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *Eur Food Res Technol* **230**, 125-133.
- Krcmar, P., and Rencova, E. (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J Food Protect* **68**, 1217-1221.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., et al. (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucl Acids Res* **28**, 655-661.
- Kwok, S., Kellog, D.E., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., and Sninsky, J.J. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl Acids Res* **18**, 999-1005.
- Lahiff, S., Glennon, M., Lyng, J., Smith, T., Shilton, N., and Maher, M. (2002). Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J Food Protect* **65**, 1158-1165.
- Laube, I., Spiegelberg, A., Butschke, A., Zagon, J., Shauzu, M., Kroh, L., and Broll, H. (2003). Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase reaction. *Int J Food Sci Technol* **38**, 111-118.
- Laube, I., Zagon, J., and Broll, H. (2007a). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int J Food Sci Technol* **42**, 336-341.
- Laube, I., Zagon, J., Spiegelberg, A., Butschke, A., Kroh, L.W., and Broll, H. (2007b). Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods. *Int J Food Sci Technol* **42**, 9-17.
- Levidow, L., and Boschert, K. (2008). Coexistence or contradiction? GM crops versus alternative agricultures in Europe. *Geoforum* **39**, 174-190.

- Lindsey, K., and Twell, D. (1994). Identification of the origin of fruit and fruit juice. Patent N. GB2283568.
- Ling, L.L., Keohavong, P., Dias, C., and Thilly, W.G. (1991). Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR Methods Appl* **1**, 63-69.
- Liu, Y.G., Liu, L.X., Lei, Z.W., Gao, A.Y., and Li, B.F. (2006). Identification of polymorphic microsatellite markers from RAPD product in turbot (*Scophthalmus maximus*) and a test of cross-species amplification. *Mol Ecol Notes* **6**, 867-869.
- Lockley, A.K., and Bardsley, R.G. (2000a). DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci Technol* **11**, 67-77.
- Lockley, A.K., and Bardsley, R.G. (2000b). Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *J Agric Food Chem* **48**, 4463-4468.
- Lockley, A.K., and Bardsley, R.G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Sci* **61**, 163-168.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., and Martín, R. (2007a). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control* **18**, 1466-1473.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., and Martín, R. (2007b). Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *Int Dairy J* **17**, 729-736.
- López de Gamboa, I., and Pardo González, M.A. (2011). Method for detection of mandarin. Patent N. EP2105510.
- López, I., and Pardo, M.A. (2005). Application of relative quantification TaqMan real-time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *J Agric Food Chem* **53**, 4554-4560.
- Mackie, I., Craig, A., Etienne, M., Jerome, M., Fleurence, J., Jessen, F., Smelt, A., Kruijt, A., Yman, I.M., Ferm, M., et al. (2000). Species identification: fish of smoked and gravad fish products by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, urea isoelectric focusing and native isoelectric focusing: a collaborative study. *Food Chem* **71**, 1-7.
- Mackie, I.M., Pryde, S.E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Pérez-Martín, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., and Rehbein, H. (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci Technol* **10**, 9-14.
- Martin, I., Garcia, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernandez, P.E., Gonzalez, I., and Martin, R. (2008). Real-time PCR for quantitative detection of bovine tissues in food and feed. *J Food Protect* **71**, 564-572.
- Martín, I., Garcia, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernandez, P.E., Gonzalez, I., and Martin, R. (2009a). Detection of horse DNA in food and feedstuffs using a polymerase chain reaction assay. *J Sci Food Agr* **89**, 1202-1206.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P.E., González, I., and Martín, R. (2008). Real-time PCR for quantitative detection of bovine tissues in food and feed. *J Food Protect* **71**, 564-572.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P.E., Martín, I.G., and Rosario (2009b). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Sci* **82**, 252-259.
- Martinez, I., and Friis, T.J. (2004). Application of proteome analysis to seafood authentication. *Proteomics* **4**, 347-354.

- Matsunaga, I., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., and Shimura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* **51**, 143-148.
- Maudet, C., and Taberlet, P. (2002). Holstein's Milk Detection in Cheeses Inferred from Melanocortin Receptor 1 (MC1R) Gene Polymorphism. *Journal of Dairy Science* **85**, 707-715.
- Melchiade, D., Foroni, I., Corrado, G., Santangelo, I., and Rao, R. (2007). Authentication of the 'Annurca' apple in agro-food chain by amplification of microsatellite loci. *Food Biotechnol* **21**, 33-43.
- Mendoza-Romero, L., Verkaar, E.L.C., Savelkoul, P.H., Catsburg, A., Aarts, H.J.M., Buntjer, J.B., and Lenstra, J.A. (2004). Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J Food Protect* **67**, 550-554.
- Meyer, R., Candrian, U., and Lüthy, J. (1994). Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR). *J AOAC Int* **77**, 617-622.
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., and Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification: fish. *J AOAC Int* **78**, 1542-1551.
- Michard, J., and Ziebal, R. (1999). Mise au point d'une méthode microscopique de détection de farine de viande, de poisson et de poisson dans les aliments pour animaux. *Fals Exp Chim* **92**, 209-223.
- Mininni, A.N., Pellizzari, C., Cardazzo, B., Carraro, L., Balzan, S., and Novelli, E. (2009). Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture. *Int Dairy J* **19**, 617-623.
- Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J., *et al.* (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* **42**, 1157-1180.
- Morales, P., Garcia, T., Gonzalez, I., Martin, R., Sanz, B., and Hernandez, P.E. (1994). Monoclonal antibody detection of porcine meat. *J Food Protect* **57**, 146-149.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**, 954-958, 960, 962.
- Myers, T.W., and Gelfand, D.H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry-US* **30**, 7661-7666.
- Nazarenko, I.A., Bhatnagar, S.K., and Hohman, R.J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucl Acids Res* **25**, 2516-2521.
- Niederer, M., and Bollhalder, R. (2001). Identification of species specific central nervous tissue by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)- a possible method for supervision of meat products and cosmetics. *Mitt Lebensm Hyg* **92**, 133-144.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Schmidt, C., Meldrup, D., and Gronkjaer, P. (2001). Fisheries - Population of origin of Atlantic cod. *Nature* **413**, 272-272.
- Pappa, E.C., Robertson, J.A., Rigby, N.M., Mellon, F., Kandarakis, I., and Mills, E.N.C. (2008). Application of proteomic techniques to protein and peptide profiling of Teleme cheese made from different types of milk. *Int Dairy J* **18**, 605-614.
- Park, J.W., and Crowley, D.E. (2005). Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE. *Biotechniques* **38**, 579-586.

- Pegels, N., Gonzalez, I., Martin, I., Rojas, M., Garcia, T., and Martin, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control* **22**, 1189-1196.
- Permingeat, H.R., Reggiardo, M.I., and Vallejos, R.H. (2002). Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR. *J Agric Food Chem* **50**, 4431-4436.
- Pfaffl, M.W. (2008). Gene-quantification info. <http://www.gene-quantification.de/>
- Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F., and Versini, G. (2003). Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Sci* **64**, 239-247.
- Pineiro, C., Barros-Velazquez, J., Vazquez, J., Figueras, A., and Gallardo, J.M. (2003). Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. *J Proteom Res* **2**, 127-135.
- Pineiro, C., Vazquez, J., Marina, A.I., Barros-Velazquez, J., and Gallardo, J.M. (2001). Characterization and partial sequencing of species-specific sarcoplasmic polypeptides from commercial hake species by mass spectrometry following two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 1545-1552.
- Prado, M., Casqueiro, J., Iglesias, Y., Cepeda, A., and Barros-Velázquez, J. (2004). Application of a polymerase chain reaction (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home-made animal meals. *J Sci Food Agr* **84**, 505-512.
- Puyet, A., and Bautista, J.M. (2009). Detection of adulterations: Identification of seafood species. In *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, L.M.L. Nollet, and F. Toldrá, eds. Boca Raton, CRC Press, pp. 687-712.
- Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, I., Perez-Martin, R.I., Rey-Mendez, M., and Mackie, I.M. (1998). Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in Species Identification of Canned Tuna. *J Agric Food Chem* **46**, 1662-1669.
- Raeymaekers, L. (1993). Quantitative PCR: Theoretical Considerations with Practical Implications. *Anal Biochem* **214**, 582-585.
- Ram, J.L., Ram, M.L., and Baidoun, F.F. (1996). Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J Agric Food Chem* **44**, 2460-2467.
- Rao, Q., and Hsieh, Y.H.P. (2007). Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats. *Meat Sci* **76**, 489-494.
- Rapisarda, P., Camin, F., Fabroni, S., Perini, M., Torrisi, B., and Intrigliolo, F. (2010). Influence of Different Organic Fertilizers on Quality Parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ Values of Orange Fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J Agric Food Chem* **58**, 3502-3506.
- Rennie, C., Noyes, H.A., Kemp, S.J., Hulme, H., Brass, A., and Hoyle, D.C. (2008). Strong position-dependent effects of sequence mismatches on signal ratios measured using long oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* **9**, 317.
- Rensen, G., Smith, W., Ruzante, J., Sawyer, M., Osburn, B., and Cullor, J. (2005). Development and evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine contaminants in cattle feed. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 152-159.
- Rensen, G.J., Smith, W.L., Jaravata, C.V., Osburn, B., and Cullor, J.S. (2006). Development and evaluation of a real-time FRET probe based multiplex PCR assay

- for the detection of prohibited meat and bone meal in cattle feed and feed ingredients. *Foodborne Pathog Dis* **3**, 337-346.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**, 154-160.
- Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P.E., and Martín, R. (2004). Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* **52**, 1478-1483.
- Rodríguez, M.A., García, T., Gonzalez, I., Hernandez, P.E., and Martín, R. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Sci* **70(1)**, 113-120.
- Rohrer, G.A., Freking, B.A., and Nonneman, D. (2007). Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. *Anim Genet* **38**, 253-258.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M.Á., Pegels, N., Hernández, P.E., García, T., and Martín, R. (2011). Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market. *Food Control* **22**, 523-531.
- Saez, R., Sanz, Y., and Toldra, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci* **66**, 659-665.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sánchez, A., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Perez-Martín, R.I., and Sotelo, C.G. (2009). Identification of European Hake Species (*Merluccius merluccius*) Using Real-Time PCR. *J Agric Food Chem* **57**, 3397-3403.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., and McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* **14**, 579-583.
- Schmidt, O., Quilter, J.M., Bahar, B., Moloney, A.P., Scrimgeour, C.M., Begley, I.S., and Monahan, F.J. (2005). Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. *Food Chem* **91**, 545-549.
- Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, A., Göbel, K.-A., and Bülte, M. (2007). Detection of central nervous system tissues in meat products: Validation and standardization of a real-time PCR-based detection system. *Vet Microbiol* **123**, 336-345.
- Sentandreu, M.A., Fraser, P.D., Halket, J., Patel, R., and Bramley, P.M. (2010). A Proteomic-Based Approach for Detection of Chicken in Meat Mixes. *J Proteom Res* **9**, 3374-3383.
- She, X., Rohl, C.A., Castle, J.C., Kulkarni, A.V., Johnson, J.M., and Chen, R. (2009). Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes. *BMC Genomics* **10**, 269.
- Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotech* **26**, 1135-1145.
- Simoneau, C., Hannaert, P., and Anklam, E. (1999). Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model systems: analysis of triglyceride profiles by high resolution GC. *Food Chem* **65**, 111-116.
- Skarpeid, H.J., Kvaal, K., and Hildrum, K.I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. *Electrophoresis* **19**, 3103-3109.

- Skarpeid, H.J., Moe, R.E., and Indahl, U.G. (2001). Detection of mechanically recovered meat and head meat from cattle in ground beef mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. *Meat Sci* **57**, 227-234.
- Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C.Y., Rostene, W., and Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* **21**, 280-285.
- Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H., and Schutten, M. (2009). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Molec Diagn* **12**, 109-117.
- Tajima, K. (2002). PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci Biotech Biochem* **66**, 2247-2250.
- Tan, W., Wang, K., and Drake, T.J. (2004). Molecular beacons. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 547-553.
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., and Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci Biotech Biochem* **71**, 3131-3135.
- Teletchea, F., Maudet, C., and Hänni, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* **23**, 359-366.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**, 291-295.
- Tindall, K.R., and Kunkel, T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry-US* **27**, 6008-6013.
- Trotta, M., Schönhuth, S., Pepe, T., Cortesi, M.L., Puyet, A., and Bautista, J.M. (2005). Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish filets from grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* species) and common substitute species. *J Agric Food Chem* **53**, 2039-2045.
- Tyagi, S., and Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotech* **14**, 303-308.
- U.S. Food and Drug Administration (2010). Regulatory Fish Encyclopedia. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/Seafood/RegulatoryFishEncyclopediaRFE/ucm071647.htm>
- Uehara, H., Nardone, G., Nazarenko, I., and Hohman, R.J. (1999). Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. *Biotechniques* **26**, 552-558.
- Vallejo-Córdoba, B., and Cota-Rivas, M. (1998). Meat Species identification: fish by linear discriminant analysis of capillary electrophoresis protein profiles. *J Capillary Electrop* **5**, 171-175.
- Vallejo-Córdoba, B., Rodriguez-Ramirez, R., and Gonzalez-Córdova, A.F. (2010). Capillary electrophoresis for bovine and ostrich meat characterisation. *Food Chem* **120**, 304-307.
- Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K., and Lenstra, J.A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci* **60**, 365-369.
- Vet, J.A., and Marras, S.A. (2005). Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. *Methods Mol Biol* **288**, 273-290.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.v.d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., *et al.* (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* **23**, 4407-4414.
- Walker, J.A., Hughes, D.A., Anders, B.A., Shewale, J., Sinha, S.K., and Batzer, M.A. (2003). Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Anal Biochem* **316**, 259-269.
- Walker, J.A., Hughes, D.A., Hedjes, D.J., Anders, B.A., Laborde, M.E., Shewale, J., Sinha, S.K., and Batzer, M.A. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics* **83**, 518-527.
- Wang, Q., Zhang, X., Zhang, H.Y., Zhang, J., Chen, G.Q., Zhao, D.H., Ma, H.P., and Liao, W.J. (2010). Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. *Meat Sci* **85**, 265-269.
- Weibin, B., Wentao, X., Kunlun, H., Yanfang, Y., Sishuo, C., and Yunbo, L. (2009). A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. *Food Control* **20**, 366-370.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., and Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech* **17**, 804-807.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., and Hahn, M. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucl Acids Res* **31**, e56.
- Wintero, A.K., Thomsen, P.D., and Davies, W. (1990). A Comparison of DNA-Hybridization, Immunodiffusion, Countercurrent Immunoelectrophoresis and Isoelectric-Focusing for Detecting the Admixture of Pork to Beef. *Meat Sci* **27**, 75-85.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., and Rasmussen, R.P. (1997a). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 134-138.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Goudry, R.A., and Balis, U. (1997b). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-181.
- Wolf, C., and Lüthy, J. (2001). Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Sci* **57**, 161-168.
- Wolf, C., Rentsch, J., and Hubner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J Agric Food Chem* **47**, 1350-1355.
- Wong, M.L., and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75-85.
- Workenhe, S.T., Kibenge, M.J., Iwamoto, T., and Kibenge, F.S. (2008). Absolute quantitation of infectious salmon anaemia virus using different real-time reverse transcription PCR chemistries. *J Virol Methods* **154**, 128-134.
- Zeunimunotec. Zeunimunotec\Productos\ Identificación de especies. <http://www.zeunimunotec.com/>
- Zha, D., Xing, X., and Yang, F. (2010). A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. *Food Control* **21**, 1402-1407.
- Zhang, C.L., Fowler, M.R., Scott, N.W., Lawson, G., and Slater, A. (2007a). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control* **18**, 1149-1158.
- Zhang, G.L., Zheng, M.G., Zhou, Z.J., Ouyang, H.S., and Lu, Q. (1999). Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci* **51**, 233-236.

- Zhang, J.B., Wang, H.J., and Cai, Z.P. (2007b). The application of DGGE and AFLP-derived SCAR for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control* **18**, 672-676.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., and Arnheim, N. (1992). Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5847-5851.