



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Propuesta de un protocolo para detectar posibles adulteraciones con Soya (*Glycine max*) y Trigo (*Triticum aestivum*) en leches y quesos comerciales en México aplicando el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

FLORES NEGRETE MAGALY

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Propuesta de un protocolo para detectar posibles adulteraciones
con Soya (Glycine max) y Trigo (Triticum aestivum) en leches
y quesos comerciales en México aplicando el método de la Reacción
en Cadena de la Polimerasa,
que presenta la pasante: Magaly Flores Negrete
con número de cuenta: 405049662 para obtener el título de :
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Mayo de 2010.

PRESIDENTE	<u>Dr José Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>Dra Susana Patricia Miranda Castro</u>	
SECRETARIO	<u>Dra Sara Esther Valdés Martínez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>IA Miriam Álvarez Velasco</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC Enrique Martínez Manrique</u>	

Nunca olvides que cuando escribes, de tu mano, sacas un poco del sentimiento que le sobra a tu corazón, nunca olvides que cuando sientes, del corazón, dejas un poco de ese estremecimiento del que está hecha la vida, nunca olvides que la vida está llena de dicha, y que para que este completa, siempre se necesita un poco de ilusión, nunca olvides que la ilusión es el derecho nato que todo ser humano tiene a la libertad.

Magaly Flores Negrete

DEDICATORIAS

Dedico la presente:

A quienes incluso desde antes de nacer me han acompañado y lo siguen haciendo incondicionalmente, de quienes mucho he aprendido y agradezco sus consejos y saber, que es la única propiedad y herencia que no puede perderse:

A mis padres Alicia Olivia Negrete Morales y J. Concepción Flores Rodríguez.

A mis hermanos Néstor y Saúl, que fueron siempre un ejemplo a seguir, y que me enseñaron a creer en lo imposible y trabajar día a día en éste que es nuestro sendero al éxito.

A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos a quienes agradezco su cariño, apoyo y confianza, y que han sido y serán una referencia para seguir adelante y proyectar lo mejor.

A mis amigos, que me honran con su amistad y afecto así como su total apoyo en las buenas y en las malas, motivo por el cual estaré eternamente agradecida.

A las generaciones pasadas de abuelos y bisabuelos que encaran las edades de nuestra historia en este mundo.

Gracias...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios, por acompañarme siempre en mi camino, por haberme permitido llegar a esta etapa en mi vida, por escuchar mis oraciones y por ayudarme a superar esos malos momentos que me hicieron más fuerte y que mucho me enseñaron a valorar la vida.

A mis padres y hermanos, pedestal de lo que soy hoy en día, referencia inevitable de educación y valores, crónica de mi vida misma y apoyo fundamental de cada instante de mi existencia.

A la UNAM, pilar en la educación profesional en México, casa del nacimiento de muchos profesionistas, escritores e investigadores exitosos y que sin duda es una referencia ineludible en todos los órdenes de la vida nacional; agradezco a esta, mi casa, por concederme formar parte de ella como estudiante y ahora como profesional de la que es y seguirá siendo una de las carreras que tienen que ser más innovadoras y que necesitan de más investigación y apoyo en nuestro país: Ingeniería en Alimentos.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
PROBLEMA.....	9
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES.....	9

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1 *LECHE Y QUESO*

1. 1.1 Definición por norma.....	10
1. 1.2 Composición química requerida por norma.....	10
1. 1.3 Adulteración.....	11
1. 1.3.1 Tipos de Adulteración.....	12
1. 1.3.2 Adulteración en leches y quesos.....	12
1. 1.4 Determinación de la adulteración.....	13
1. 1.4.1 Método de separación de las proteínas de la leche y determinación de la adulteración.....	13

1.2 *GENERALIDADES DE LA PCR*

1. 2.1 Antecedentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	14
1. 2.2 Descripción.....	16

1. 2.3	Fundamentos.....	16
1. 2.4	Etapas de la reacción durante la PCR.....	17
1. 2.4.1	Desnaturalización.....	18
1. 2.4.2	Hibridación.....	18
1. 2.4.3	Polimerización (elongación, extensión ó replicación).....	20
1. 2.5	Componentes que se requieren para llevar a cabo una PCR.....	21
1. 2.5.1	DNA.....	21
1. 2.5.2	Taq Polimerasa.....	22
1. 2.5.3	Amortiguador (Buffer).....	24
1. 2.5.4	Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTP's).....	24
1. 2.5.5	Cloruro de Magnesio (MgCl ₂).....	25
1. 2.5.6	“PRIMERS” específicos.....	26
1.2.6	Técnicas para la evaluación de PCR.....	27
1.2.6.1	Electroforesis.....	27

1.3 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA PCR Y DNA MITOCONDRIAL

1. 3.1	Métodos para la identificación de especies.....	29
1. 3.1.1	Métodos basados en proteínas.....	30
1.3.1.1.2	Ventajas y desventajas de las técnicas basadas en proteínas.....	31
1. 3.2	Técnicas basadas en ácidos nucleicos.....	32
1.3.2.1	Ventajas y Desventajas de la PCR.....	32
1.3.3	DNA Mitocondrial.....	32
1.3.3.1	Mitocondria.....	32
1.3.3.2	mtDNA.....	33
1.3.3.3	Cyt b.....	35

**CAPITULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y PLANTEAMIENTO DEL
PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE SOYA Y TRIGO EN QUESO Y EN LECHE
LIQUIDA Y EN POLVO**

2.1 Cuadro Metodológico.....	37
2.1.1 Descripción del cuadro metodológico.....	38
2.2 Materiales y equipos.....	41
2.2.1 Muestras requeridas.....	41
2.2.2 Reactivos.....	41
2.2.3 Equipos.....	42
2.3 Métodos.....	43
2.3.1 Extracción de DNA.....	43
2.3.1.1 Cuantificación de DNA.....	44
2.3.1.2 Amplificación de DNA (Preparación de la reacción).....	47
2.4 Programación del termociclador.....	48
2.5 Evaluación de PCR.....	49
2.5.1 Preparación del gel de Agarosa.....	49
2.5.2 Carga y corrida del gel de agarosa por Electroforesis Horizontal.....	50
2.5.3 Fotografía del gel.....	52

CAPITULO III. *DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS*

3.1 Resultados por objetivo.....	53
3.1.1 Objetivo particular 1. Extracción y cuantificación del DNA de proteína aislada de soya y trigo.....	53
3.1.2 Objetivo particular 2. Análisis del mtDNA de interés.....	54
3.1.2.1 Selección y diseño de “PRIMERS”.....	54
3.1.3 Objetivo particular 3. Especificidad de “PRIMERS”.....	56
3.1.4 Objetivo particular 4. Aplicación del protocolo para la detección de soya y trigo.....	57
3.2 Discusión.....	64
Conclusiones.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	71

Anexos

ÍNDICE DE FIGURAS

	pag
Fig. 1.-Etapas de la reacción.....	17
Fig. 2. Representación del mecanismo cíclico de la PCR.....	21
Fig. 3. Perfil de muestras amplificadas en un gel de Agarosa.....	28
Fig. 4. Regiones del mt DNA humano.....	35
Fig. 5. Esquematización del programa utilizado en el termociclador para Soya.....	49
Fig. 6. Esquematización del programa utilizado en el termociclador para Trigo.....	49
Fig. 7. Diseño de “PRIMERS”.....	55
Fig. 8. Especificidad de los “PRIMERS” de Soya.....	56
Fig. 9 Resultados de detección de presencia de soya en quesos.....	60
Fig. 10 Resultados de detección de presencia de soya en leche de vaca.....	61
Fig. 11 Resultados de detección de presencia de soya en leche en polvo para niño y adulto.....	62
Fig. 12 Resultados de detección de presencia de trigo en quesos.....	62
Fig. 13 Resultados de detección de presencia de trigo en leche de vaca.....	63
Fig. 14 Resultados de detección de presencia de trigo en leche en polvo para niño y adulto.....	63
Fig. 15 Resultados para comprobar la calidad del DNA de las muestras L8, Ln4, M1 y P3..	76

ÍNDICE DE IMÁGENES

	pag
Imagen 1. Muestras etiquetadas para extracción de DNA.....	43
Imagen 2. Adición de solución de lisis con micropipeta.....	43
Imagen 3. Mezclador vortex.....	44
Imagen 4. Baño seco.....	44
Imagen 5. Centrifuga Mini Spin.....	44
Imagen 6. Separación de fases.....	45
Imagen 7. Autoclave para esterilizar el material (puntas y tubos eppendorf).....	45
Imagen 8. Precipitación de DNA.....	45
Imagen 9. Espectrofotometro NanoDroop.....	46
Imagen 10. Lectura de datos.....	47
Imagen 11. Mezclador con control de temperatura Termomixer.....	47
Imagen 12. Termociclador Perkin Elmer Gen Amp.....	48
Imagen 13. Termociclador Apollo.....	48
Imagen 14. 100pb DNA ladder.....	50
Imagen 15. Bromuro de Etidio y blue orange en parafilm.....	51
Imagen 16. Caja de electroforesis con el gel de agarosa dentro.....	51
Imagen 17. Electroforesis corriendo.....	51
Imagen 18. Fuente de poder.....	52
Imagen 19. Cámara y transiluminador UV.....	52
Imagen 20. Especificidad de los “PRIMERS” de Trigo.....	54
Imagen 21. Productos analizados.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

	pag
Tabla 1. Especificaciones de leche pasteurizada, ultrapasteurizada y microfiltrada ultra...	11
Tabla 2. Diseño de “PRIMERS”: propiedades de los Oligonucleótidos que influyen la eficiencia de amplificación.....	39
Tabla 3. Componentes de la PCR, preparación de la reacción.....	48
Tabla 4. Cantidades para cargar el gel de electroforesis.....	50
Tabla 5. Extracción de DNA de proteína aislada de soya.....	53
Tabla 6. Extracción de DNA de proteína de Trigo (gluten).....	53
Tabla 7. Resultados de la extracción de DNA.....	59

INTRODUCCIÓN

Los aislados proteínicos vegetales pueden ser usados como complementos para enmascarar características deseadas en productos lácteos, los problemas de autenticación de especies con el propósito de prevenir simulaciones existen en todas sus áreas, y ahí se han tenido muchas aproximaciones analíticas para la detección de adulteraciones. Actualmente algunos productores en la industria láctea se valen del uso de almidones, colorantes, saborizantes, grasas y complementos proteicos entre otros ingredientes para mejorar el sabor y textura de los productos lácteos, sin embargo algunos de estos también se emplean como adulterantes para poder cumplir con los requisitos establecidos para su comercio según la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Micro Kjeldahl, Cromatografía Líquida y Electroforesis Capilar son algunas de las técnicas que en esta norma se decretan como métodos de prueba para su cumplimiento (1).

La venta fraudulenta en la industria de alimentos de productos de baja calidad ha provocado con el apoyo de la biotecnología moderna el empleo de métodos basados en reconocimiento de DNA para proteger al consumidor (2). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es indudablemente la técnica genética más común usada para rastrear el origen de las especies contenidas en los alimentos (3). El propósito de la PCR es sintetizar millones de copias de un fragmento selecto de la molécula de DNA específica de la especie de interés (4).

En los últimos años las industrias de alimentos han desarrollado productos lácteos que contienen grasas vegetales y caseinato de sodio. Como resultado de su incremento en costo, se han hecho intentos para usar proteína aislada para reemplazar la proteína láctea en tales productos (5). Es por eso que es necesario el planteamiento de un protocolo para la identificación de Soya y Trigo en los productos que las puedan contener como agentes adulterantes que son agregados a su fórmula con el propósito de cubrir características deseadas, tal es el caso de la Soya y el Trigo en leches y quesos.

PROBLEMA

Los aislados proteínicos vegetales pueden ser usados como complementos para enmascarar la falta de características deseadas en productos lácteos.

HIPÓTESIS

Si los extractos y aislados proteicos que se utilizan en algunos productos lácteos no son 100% puros, entonces se encontrará en ellos presencia de DNA disponible de Soya y/o Trigo para ser amplificado por PCR en leches y quesos que los puedan contener.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para detectar posibles adulteraciones con Soya (*Glycine max*) y/o Trigo (*Triticum aestivum*) en leches y quesos comerciales en México aplicando el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

OBJETIVOS PARTICULARES

Objetivo Particular 1.- Extraer y cuantificar el DNA de extractos de proteína de soya y trigo para obtener las soluciones control a analizar por PCR para la identificación de la posible adulteración.

Objetivo Particular 2.- Analizar la secuencia del mtDNA de la soya y el trigo para seleccionar los “PRIMERS” que delimitaran las zonas de interés.

Objetivo Particular 3.- Comparación de los “PRIMERS” diseñados contra otras secuencias genómicas para evaluar su especificidad.

Objetivo Particular 4.- Aplicación del protocolo para detectar la presencia de soya y trigo en distintos tipos de leches y quesos comerciales en México.

Objetivo Particular 5.- Evaluación y análisis de los resultados obtenidos.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.- LECHE Y QUESO

1.1.1 Definición por norma

Leche:

Leche pasteurizada. “La que ha sido sometida al proceso de pasteurización, estandarizada o no”. Pasteurización es el tratamiento térmico al que se somete la leche, fórmula láctea o el producto lácteo combinado, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos (6).

Leche ultrapasteurizada. “La que ha sido sometida al proceso de ultrapasteurización, estandarizada o no”. Ultrapasteurización es el proceso que incluye el tratamiento térmico al que se somete la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la esterilidad comercial y envasado aséptico. (6).

Denominaciones comerciales de queso tipo manchego y panela:

Queso tipo manchego. Es el producto que se obtiene a partir de leche pasteurizada entera de vaca, sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, fermentado, salado, prensado y madurado, durante un período mínimo de 7 días a temperatura y humedad controladas; sin que se hayan empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de la leche (7).

Queso tipo Panela. “Es un queso fresco elaborado con leche natural de vaca, pasteurizada, no acidificada y que puede ser entera o parcialmente descremada” (8).

1.1.2 Composición química de la leche requerida por norma

Tabla 1. Especificaciones de leche pasteurizada, ultrapasteurizada y microfiltrada ultra

Especificaciones	Entera	Parcialmente descremada	Descremada
Densidad a 15°C, g/ml	1,029 mín.	1,029 mín.	1,031 mín.
Grasa butírica g/L	30 mín.	28 máx. 6 mín.	5 máx.
Acidez (expresada como ácido láctico) g/L	1,3 mín. 1,7 máx.	1,3 mín. 1,7 mín.	1,3 mín. 1,7 mín.
Sólidos no grasos de la leche, g/L	83 mín.	83 mín.	83 mín.
Punto crioscópico °C (°H)	Entre -0,510 (-0,530) y -0,536 (-0,560)	Entre -0,510 (-0,530) y -0,536 (-0,560)	Entre -0,510 (-0,530) y -0,536 (-0,560)
Lactosa g/L	43 mín. 50 máx.	43 mín. 50 máx.	43 mín. 50 máx.
Proteínas propias de la leche g/L	30 mín.	30 mín.	30 mín.
Caseína g/L	21 mín.	21 mín.	21 mín.
<p>Nota: La leche ultrapasteurizada y microfiltrada ultra debe tener un punto crioscópico de entre -0,499°C (-0,520 °Horvet) y -0,529°C (-0,550 °Horvet).</p> <p>Nota: En leche, la relación caseína proteína debe ser al menos de 70% (masa/masa).</p>			

Composición requerida según la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Página 11 (6).¹

1.1.3 Adulteración

Se define a este término remitiendo a alteración y falsificación. El fraude por adulteración es cuando el producto alimenticio sufre una transformación voluntaria por parte de un agente económico del sector, de manera que las cualidades intrínsecas del producto se hallan modificadas. El interés de este tipo de fraude reside en el bajo costo de uno o varios ingredientes del producto (10).

En el caso de la leche hablamos de adulteración cuando la naturaleza o composición de la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, no corresponda a aquellas con las que se denomine, etiquete, anuncie, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones establecidas en esta norma oficial mexicana, o cuando la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, hayan sido objeto de tratamiento que disimule su alteración o encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas (6).

1.1.3.1 Tipos de Adulteración

Las adulteraciones se dividen principalmente en 2 tipos:

1.- Por contaminación: se fija la adulteración de manera no intencional, son sustancias prohibidas pero presentes en tal cantidad que rebasan el nivel fijado por vía reglamentaria (10).

¹ Los quesos manchego y panela no tienen tabla de composición química en la norma NOM-121-SSA1-1994 (9).

2.- Intencional: cuando, entre los ingredientes de un producto, se sustituye una especie vegetal o animal por otra. Se puede contemplar bajo el ángulo de fraude por sustitución si es que este no modifica las propiedades organolépticas del producto (10).

1.1.3.2 Adulteración en leches y quesos

Los estándares de composición de la mayoría de los productos de leche requiere que estos contengan exclusivamente proteínas lácteas, pero los bajos precios de algunas proteínas vegetales las hacen atractivas para perpetrar en fraudes (11); este es el caso para leches líquidas y en polvo así como en algunos tipos de quesos. En la Tabla 1 se muestran las especificaciones requeridas por norma para la leche.

La proteína de soya es probablemente el reemplazante vegetal más utilizado como proteína no láctea. Cereales como el trigo y el chícharo al igual que la soya tienen las características y el precio anhelado por los productores de alimentos para ser usados como reemplazantes proteicos que además en algunos casos confieren características deseadas en productos de leches y quesos (11).

1.1.4 Determinación de la adulteración

1.1.4.1 Método de separación de las proteínas de la leche y determinación de la adulteración

El monitoreo de la adulteración de la leche se puede realizar separando las diferentes proteínas presentes en el suero y la grasa. El método que se puede usar exitosamente para este tipo de prueba es la técnica de Electroforesis Capilar. Esta técnica se aplica para cualquier tipo de adulteración proteica aunque técnicas antecedentes a esta que aplican el

mismo principio de estudio pueden presentar resultados de igual manera que la electroforesis capilar (6).

Fundamento:

El perfil de proteínas obtenido por Electroforesis Capilar es característico del origen de la leche. Generando tal perfil, se puede determinar si existe una adulteración y cuál es el origen y la proporción de ésta. Esta técnica permite la separación simultánea de las proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina). Comparando los perfiles estándares de leche de vaca con los perfiles de muestras desconocidas y perfiles de productos adulterantes posibles se determina el tipo de adulteración. La adulteración se determina en proporción del adulterante utilizando curvas estándares generadas con muestras artificiales en diferentes proporciones de los posibles adulterantes² (6).

1.2 GENERALIDADES DE LA PCR

1.2.1 Antecedentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los orígenes de la PCR tal cual se conoce hoy en día surge de investigaciones importantes realizadas a principios de 1980 en “Cetus Corporation” en California. En el verano de 1983 Kari Mullis tuvo la idea original para el PCR mientras viajaba en su auto. Esta idea exigió ser el origen de la PCR moderna que es usada alrededor del mundo, hoy en día esta forma parte de la fundación de las más importantes patentes de PCR. En 1993 ganó el premio nobel de Química (12).

El concepto original para PCR, como muchas otras buenas ideas, era una fusión de varios componentes que ya estaban en existencia como: síntesis de longitudes cortas de DNA (oligonucleótidos) y el uso de estos para dirigir el blanco específico en la síntesis de las

² Por esto es necesario la implantación de protocolos de identificación de especies que faciliten la lectura de los resultados.

nuevas copias de DNA usando DNA polimerasa que para estos días ya era la herramienta más usada de entre el repertorio de técnicas de investigación de los biólogos moleculares de aquel tiempo. La novedad en el concepto de Mullis es que estaba usando la yuxtaposición de dos oligonucleótidos, complementando a las cuerdas opuestas del DNA, para específicamente amplificar la región entre ellos y lograrlo de forma repetitiva y así el producto de uno de los ciclos de la actividad de la polimerasa se va agregando a la información de las plantillas del siguiente ciclo y así sucesivamente generando de esta manera en poco tiempo miles de copias del DNA selecto (diana) de la molécula de DNA específica de la especie, que muestre diferencias en la secuencia de nucleótidos. (4 y 12). En la Figura 1 se muestran las etapas de esta reacción.

La DNA polimerasa originalmente usada para PCR fue extraída de la bacteria *Escherichia coli*. Aunque esta enzima había sido una valiosa herramienta para una gama amplia de aplicaciones y había permitido un gran avance en la tecnología de la secuenciación del DNA en aquella década, tenía desventajas distintas en PCR. Para PCR, la reacción debe ser calentada para poder desnaturalizar la cadena de DNA después de cada ciclo de síntesis. Desafortunadamente, calentando, también se inactiva irreversiblemente la *Escherichia coli* DNA polimerasa, y por consiguiente las alícuotas frescas de la enzima tenían que ser agregadas manualmente al principio de cada ciclo. Lo que aquí se requería era una DNA que permaneciera estable durante la desnaturalización del DNA alrededor de los 95°C. La solución fue encontrada cuando la bacteria *Thermophilus aquaticus* se aisló del ambiente en donde sobrevivía y proliferó a temperaturas sumamente altas, fue así como se obtuvo una DNA que no era inactivada rápidamente a altas temperaturas (12).

A veces, incluso con estas mejoras, la técnica de PCR seguía siendo lenta y laboriosa ya que requería de transferencias totalmente manuales entre baños de agua a diferentes temperaturas. El primer Termociclador “Mr Cycle” que replicaba los cambios de temperatura requeridos para la reacción de PCR sin necesitar de la transferencia manual fue desarrollado por Cetus para facilitar la adición de la polimerasa termolábil fresca. Después

de la purificación de la Taq polimerasa, Cetus y Perkin – Elmert introdujeron los termocicladores de DNA cerrados que son usados hoy en día (12).

1.2.2 Descripción

Aún cuando existe un gran número de métodos para la clonación y secuenciación de DNA, el PCR es el método más viejo en teoría y el más versátil en práctica. Es un método simple, rápido, flexible, al que pueden aplicarse un gran número de variaciones que dependen del propósito al que se aplica (13). Ver Figura 1.

La PCR tiene un alto potencial para la identificación de especies debido a su creciente sensibilidad y especificidad cuando se compara con los ensayos de proteínas e hibridación con sondas de DNA (13).

El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de PCR (17).

1.2.3 Fundamentos

El fundamento se basa en la síntesis de millones de copias de un fragmento específico de DNA determinado por el apareamiento de dos moléculas cebadoras sintéticas (cebadores ó “PRIMERS”) que son pequeñas secuencias de nucleótidos sintéticos escogidos con secuencias complementarias a los finales opuestos de las cadenas simples del fragmento de DNA seleccionado, estos dirigen la síntesis de millones de copias del fragmento objetivo (4), la síntesis y copia del fragmento de DNA sucede por la reacción de un DNA (que resulta de la desnaturalización de la cadena doble original), formando una nueva cadena doble que posteriormente será sujeto de desnaturalización y plantilla de nuevas moléculas de DNA (14).

La importancia para la reacción de replicación es que esta es manejada por una molécula-polimerasa estable al calor que lee una plantilla de DNA en la dirección 3' – 5' y que sintetiza una nueva plantilla complementaria en la dirección 5' – 3', usando desoxinucleótidos trifosfatos libres (dNTP's = nucleótidos base) como ladrillos (15).

1.2.4 Etapas de la reacción durante la PCR

Esta reacción no es precisamente una técnica, sino mas bien una metodología en la que se aplican tres conceptos fundamentales: 1.- Desnaturalización de la cadena doble de DNA, 2.- Hibridación de la hebra sencilla con oligonucleótidos y 3.- Replicación de las hebras sencillas de DNA por la acción de una DNA polimerasa a partir del oligonucleótido mencionado (14). En la Figura 1 se aprecian las etapas de la PCR.

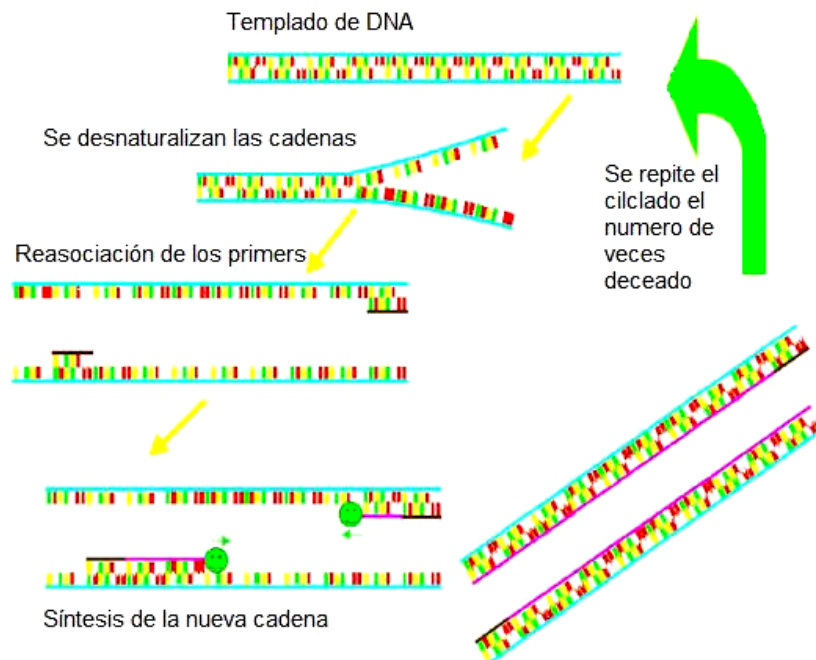


Figura 1.-Etapas de la PCR³ (16).

³ Dicha reacción tiene una amplificación exponencial, es decir de una primera copia después de 30 ciclos durante la PCR llega a tener aproximadamente 1 millón de copias (14).

1.2.4.1 Desnaturalización

La separación de las hebras simples de la molécula de DNA se consigue por la ruptura de los puentes de hidrógeno entre pares de bases y se complementa con la eliminación de las interacciones hidrofóbicas entre bases. Las dos hebras del DNA se separan y pasan a una conformación al azar sin que se altere la estructura primaria, pues no hay ruptura de enlaces covalentes (17).

Se trata de una etapa crítica ya que es muy importante que el DNA molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C de 30 segundos a 1 minuto. Si tiene alto contenido de Guanina (G) + Citosina (C) puede aumentar la temperatura debido al mayor número de puentes de Hidrógeno (18).

La desnaturalización puede llevarse a cabo por efectos de agentes químicos desnaturalizantes o por calentamiento, que es lo más adecuado para la técnica de PCR, generalmente a temperaturas mayores de 68°C y menores de 97°C. La temperatura de desnaturalización debe ser superior a la temperatura de fusión (T_m) de la región de DNA que se desea amplificar (19).

1.2.4.2 Hibridación

Se llama así debido a que en esta etapa las hebras sencillas se unen a los oligonucleótidos sintéticos. Esta etapa se asemeja en gran medida a la hibridación de DNA, aunque en este caso, el DNA se une a un hebra corta (menor a 30) de los “PRIMERS” frontal y reverso que servirán para iniciar la reacción.

La hibridación es también denominada etapa de templado, debido a la disminución de temperatura que permite la reasociación de hebras sencillas con los oligonucleótidos sintéticos tras la desnaturalización térmica; en inglés “annealing” (17).

En esta etapa la temperatura y el tiempo van a depender de tres factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración.

En la práctica la temperatura de hibridación puede oscilar entre 45 y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o de tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde. Si el “PRIMER” es menor a 20pb, la T_m se calcula basándose en la Fórmula 1:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \quad (1)$$

Siendo Guanina (G), Citosina (C), Timina(T) y Adenina (A) el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos (18).

La temperatura de “annealing” T_m , se relaciona directamente con la desnaturalización y depende del contenido de pares de bases C=G o A=T de la cadena de DNA. Mientras los pares de bases C=G sean más abundantes que A=T, la temperatura de fusión aumentará debido a que la interacción en C=G es más fuerte que A=T. Esto implica que para que suceda la desnaturalización la T_m deba ser rebasada y todas las interacciones logren romperse y viceversa, la temperatura de hibridación debe ser menor que T_m (14).

Es recomendable que la T_m sea la misma para ambos “PRIMERS”, de lo contrario se aconseja disponer de una T° intermedia de entre las dos calculadas.

Esta etapa requiere de un enfriamiento rápido por debajo de la T_m de los oligonucleótidos para que las hebras puedan unirse por completo de forma que suceda la hibridación (17).

1.2.4.3 Polimerización (elongación, extensión ó replicación)

Esta es la etapa de la amplificación propiamente dicha, aquí la DNA polimerasa se encarga de elongar los oligonucleótidos de acuerdo con la hebra sencilla de DNA que en este caso sirve de molde para generar una nueva cadena doble de DNA. El sustrato de la enzima son los dNTP's (17).

La replicación se lleva a cabo en la dirección $5' \rightarrow 3'$ a partir del extremo $3' - OH$ de cada cebador, hasta terminar la lectura de la plantilla o hasta que comience una nueva etapa de desnaturalización. En esta etapa la DNA polimerasa no ha sido simbolizada, sin embargo se ha encargado de unir ya algunos dNTP's a la cadena complementaria siguiendo la dirección $5' \rightarrow 3'$ a partir de cada "PRIMER" (15).

Al finalizar esta etapa se obtienen nuevamente cadenas dobles, pero duplicando a las que existían al principio de la desnaturalización. En un primer ciclo las cadenas nuevas no tienen un tamaño especial, sin embargo este se irá afinando conforme los ciclos progresen (13).

En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a $72^{\circ}C$. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70 y $72^{\circ}C$. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar el tiempo de 1 minuto para elongar 1Kb (19).

Las tres etapas mencionadas se repiten cíclicamente. Complementariamente a cada etapa se añade una inicial y una final. La primera implica elevar la temperatura a un nivel superior a la etapa de desnaturalización, logrando la inactivación de proteasas y nucleasas de la muestra y, al mismo tiempo, es posible asegurar una completa desnaturalización del DNA inicial. La etapa final consiste además en la prolongación de la última elongación a fin de permitir que se completen todos los fragmentos. El número de ciclos puede variar en un rango de 20 a 40 ciclos (17).

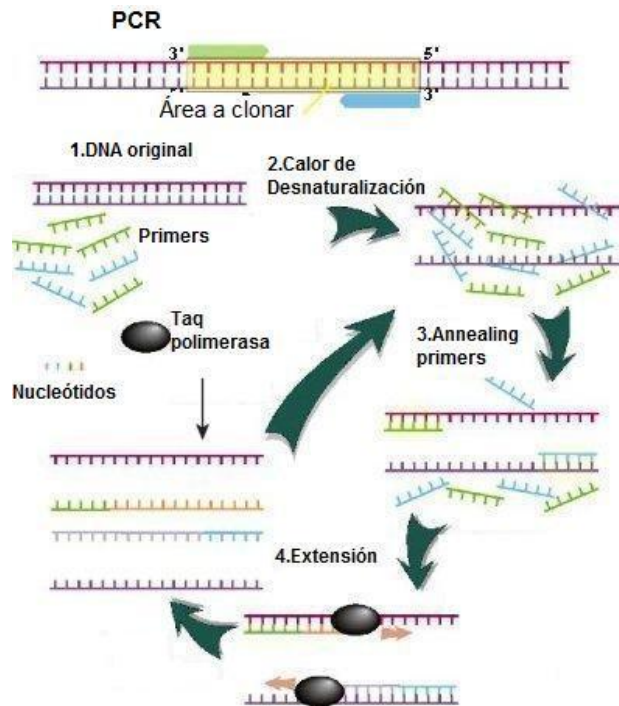


Figura 2. Representación del mecanismo cíclico de PCR (20).

1.2.5 Componentes que se requieren para llevar a cabo una PCR

1. DNA
2. Taq polimerasa
3. Amortiguador (Buffer)
4. dNTP's
5. $MgCl_2$
6. "PRIMERS" Frontal y Reverso específicos de cada especie

1.2.5.1 DNA

La adición de DNA a la reacción implica su previa extracción de la célula, producto o tejido de la especie de interés, así como su previa solubilización en agua. En teoría, si se utilizan

las condiciones óptimas en relación con los “PRIMERS”, el número de ciclos adecuado, la concentración del resto de componentes y el volumen de la reacción recomendados, de manera que la reacción trabaje al máximo, entonces debe ser suficiente la adición de una sola cadena simple de DNA al inicio de la reacción para una amplificación exitosa, además de que se requiere de una concentración del DNA adecuada (de 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 1.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para el éxito del amplificado durante la PCR (21). Si la concentración de DNA es menor a la requerida; es probable que no se visualice una banda clara en el gel de agarosa, por otro lado, si la concentración es muy alta, la DNA polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de DNA (14). Ver tema 2.3.1 que describe la extracción de DNA.

Diferentes fuentes pueden proporcionar material para tener una amplificación exitosa del DNA. Los requisitos principales son que el DNA debe de estar intacto por encima de la longitud a amplificar. Esto puede significar que solo fragmentos cortos van a poder ser amplificados de fuentes en donde el DNA ya esta degradado. En algunos casos el fallo de una PCR se puede recuperar usando una alta dilución de la fuente de DNA, probablemente porque los inhibidores también están diluidos dentro de nuestra fuente. Esto es esencial para asegurar la correcta desnaturalización de la plantilla antes de empezar la PCR (22).

1.2.5.2 Taq Polimerasa

En los años 70 se desarrollaron los métodos que permitieron de manera simple y relativamente rápida la determinación de secuencias nucleotídicas de cualquier fragmento de DNA. Existen diferentes tipos de DNA polimerasa que llevan a cabo la replicación del DNA. Se pueden clasificar en:

Termolábiles: T° óptima de 37 – 42 $^{\circ}\text{C}$. Se desnaturalizan con el calor.

Termoestables: T° óptima de 74 $^{\circ}\text{C}$ (como la Taq polimerasa)

La polimerasa que se utiliza es la Taq Polimerasa, que es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. La Taq polimerasa ha simplificado enormemente la técnica de la PCR ya que ha permitido su automatización (para el desarrollo del termociclador) (18, 23).

Debido a que las etapas de la reacción involucran temperaturas variables, se requiere de una enzima termoestable que, de igual manera soporte temperaturas cercanas a los 100°C. Esta característica es la que le permite a la enzima actuar durante varios ciclos sin desactivarse aunque existe una gran variedad de enzimas, la enzima más empleada es la Taq polimerasa (24). Ver tema 2.1.

Las polimerasas termoestables como la *Taq polimerasa*, carecen de actividad 3'→5' exonucleasa, lo que las hace menos seguras a la hora de comparar las fidelidades. Por ello se deben tener las siguientes consideraciones para que su actividad aumente y así poder tener un óptimo funcionamiento de la enzima y una PCR exitosa:

- No usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de éstos.
- La concentración de los dNTP's debe ser igual para los cuatro (se describen en el tema 2.5.4 pp 20) y debe ser la más baja posible para poder conseguir la cantidad de DNA necesario.
- Disminuir en lo posible el tiempo en cada etapa.
- La concentración de Mg²⁺ en la reacción debe oscilar entre 0.5 y 2.5µM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad del PCR (23).

La *Taq polimerasa* tiene el inconveniente de carecer de actividad correctora de pruebas (exonucleasa 3') por lo que la frecuencia de errores es superior a la de replicación (alrededor

de un error por cada 5000 nucleótidos incorporados); de ahí que en ocasiones se sustituya por otras DNA polimerasa termoestables. Así pues, aunque la *Taq polimerasa* fue la primera enzima termoestable aislada, en estudios más vastos de PCR (por ejemplo cuando se requiere de mayor fidelidad, la longitud de la plantilla a amplificar es mayor de 1 Kb o cuando se desea clonar RNA mitocondrial con PCR inversa), la *Taq polimerasa* ha demostrado ciertas desventajas con respecto a otras enzimas que ya están disponibles y que presentan aplicaciones de DNA polimerasa termoestables, dicha descripción incluye hasta 10 enzimas distintas de la *Taq polimerasa* (19, 17).

1.2.5.3 Amortiguador (Buffer)

Se han publicado para PCR el uso de muchas soluciones amortiguadoras también conocidas como solución de lisis que contiene Tris a una concentración de 10mM (pH 8.4), 50mM de KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatina y 0.01% (22).

1.2.5.4 Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTP's)

Son nucleótidos sintéticos que no forman ninguna secuencia al inicio de la reacción, es decir, son el sustrato de la enzima DNA polimerasa y serán los componentes de miles de copias del fragmento diana al final de la reacción.

Los dNTP's son 4 y se enlistan a continuación:

- a) Desoxi Adenosin Trifosfato (dATP's)
- b) Desoxi Tiamisin Trifosfato (dTTP's)
- c) Desoxi Guanosin Trifosfato (dGTP's)
- d) Desoxi Citosin Trifosfato (dCTP's)

El dNTP precursor se puede obtener del secado por congelación o como neutralización de soluciones acuosas. Son estables a -20°C por algunos meses en cualquier configuración, pero los agentes secados por congelación pueden requerir de una neutralización por KOH antes de su uso (22).

Se deben añadir a la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los $200\mu\text{M}$. No se debe variar ninguno de ellos de manera independiente. Pueden captar Mg^{2+} , por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. Se aconseja que la concentración de Mg^{2+} sea de $0.5 - 1.0 \mu\text{M}$ veces superior a la concentración de dNTP's (18).

1.2.5.5 Cloruro de Magnesio (MgCl_2)

La concentración de el Co-factor esencial, MgCl_2 , puede tener un particular y profundo efecto en la especificidad y el rendimiento de la PCR (15).

- La concentración del Mg^{2+} afecta a la reacción diferencialmente a altas o bajas concentraciones (hasta 3mM) e influye en términos de especificidad y rendimiento de la reacción de amplificación.
- El Mg^{2+} forma complejos solubles con los dNTP's construyendo bloques para hacer que ellos sean reconocidos como sustratos por la enzima.
- La concentración de Mg^{2+} libres es determinada por la presencia y concentración de agentes quelantes como los ácidos etilendiaminotetracéticos (EDTA), los pirofosfatos libres y los dNTP's (15).

La concentración de Magnesio puede influenciar en:

- Desnaturalización de los "PRIMERS"
- Disociación de la hebras con la temperatura
- Especificidad del producto

- Formación de dímeros de “PRIMER”
- Actividad/fidelidad de la enzima (15).

1.2.5.6 “PRIMERS” específicos

Los “PRIMERS” oligonucleótidos son generalmente sintetizados en el rango de 18-30 bases, así es también posible amplificar bajos complejos de DNA con “PRIMERS” más cortos. Las secuencias de “PRIMERS” deben ser similares al contenido de G+C, mínima estructura secundaria (misma complementariedad) y baja complementariedad para cada una de las demás, peculiarmente en la región 3'. Se ha encontrado que “PRIMERS” largos de 24 a 30 bases trabajan bien durante la etapa de “ANNEALING” de 60°C y más, y tienden a ser más robustos en PCR de muestras difíciles. La selección del programa de PCR es viable (Software epicentro) que aunque es bastante crudo, provee de algo de ayuda con el diseño de “PRIMERS”. Quizá el análisis de la secuencia de DNA podría desarrollar programas más sofisticados para este propósito (22). Ver Figura 2.

Los efectos de la redundancia y la desigualdad de la eficiencia de los “PRIMERS” confirman o no su amplificación durante la PCR (4).

Cuando se refiere al uso de “PRIMERS” específicos de las especies, se espera que estos generen solo un producto en la presencia de DNA a partir de las especies dadas, bajo las condiciones estrictas e idóneas para la reacción. La información de la secuencia completa permite predecir el tamaño del producto, de modo que la identificación se confirma si el amplificado se ve del tamaño apropiado en un gel, es decir, la presencia del producto de PCR es considerado como prueba de su identidad⁴ (4).

⁴ Dicha identidad puede ser confirmada con un gel de agarosa en electroforesis y un transiluminador UV utilizando el DNA de la especie en cuestión y el DNA de especies lejanas ó cercanas. También se pueden usar programas bioinformáticos en donde se escriben las secuencias de “PRIMERS” y la computadora los compara con su base de datos. Ver tema 3.1.3.

1.2.6 Técnicas para la evaluación de la PCR.

El producto de un PCR debe de ser un fragmento o fragmentos de DNA de una longitud definida. La forma más fácil de comprobar esto es cargando una fracción del producto de la reacción usando un marcador de peso molecular apropiado en un gel de agarosa de 0.8 – 4% con bromuro de etidio. El producto debe ser visible en un transiluminador ultravioleta. Productos pequeños de DNA (“PRIMERS” – dímeros) y a veces los mismos “PRIMERS” pueden ser vistos como bandas bastante difusas y cerradas al frente principal del gel, pero el producto podría aparecer como una banda fantasma del tamaño esperado. La presencia de bandas adicionales pueden ser debidas a preparaciones no específicas, que ocurren por una variedad de razones, o por la presencia de algunos productos externos, que pueden ocurrir si el “PRIMER” está presente en cantidades molares desiguales ⁵ (22). Ver Imagen 21.

1.2.6.1 Electroforesis

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico como consecuencia de su relación carga/masa. Los ácidos nucleicos cargados negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura son separados de acuerdo a la carga y peso molecular de cada tipo de moléculas presentes. La naturaleza del enlace fosfodiéster de las cadenas polinucleotídicas condiciona la carga de un ácido nucleico que es aproximadamente igual al número de grupos fosfato (25).

⁵ En la Figura 3. Se pueden apreciar tres amplificaciones de la misma especie tras la PCR y su análisis en un gel de Agarosa y su 27electroforesis horizontal que es capaz de separar fragmentos que no pueden ser separados por otros procedimientos.

La electroforesis en gel de Agarosa se realiza en contenedores horizontales y requiere de dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguador que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa (agarosa) que da un tamaño de poro homogéneo y que se haya sumergido y embebido en la fase móvil (26) como se muestra en la Figura 3, en donde se observa la verificación de productos de PCR en un gel de agarosa usando “PRIMERS” específicos para 3 muestras de una misma especie.

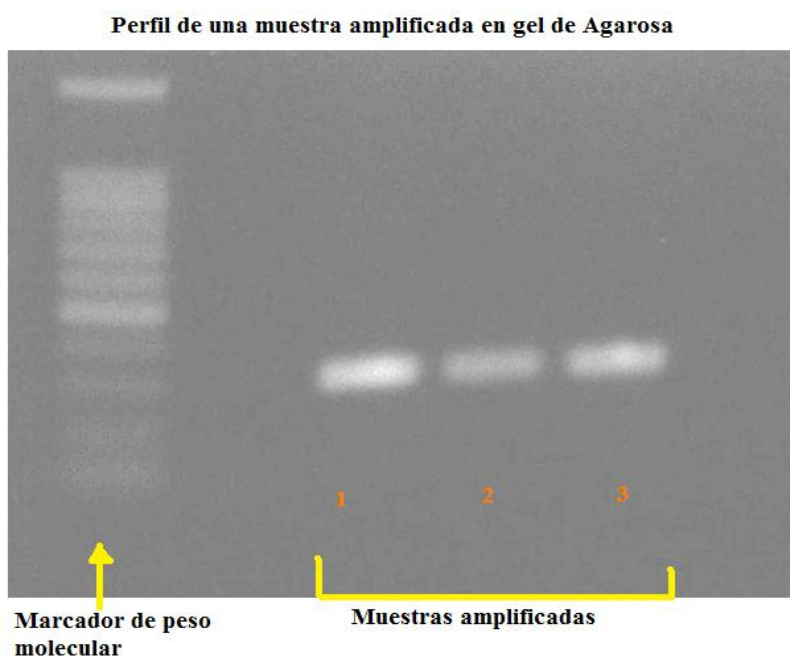


Figura 3. Perfil de muestras amplificadas en un gel de Agarosa.

Es necesario que todos los componentes de la mezcla a separar se encuentren cargados de igual forma, de manera que al hacer el depósito de la muestra sobre el soporte de uno de los polos, se dirijan todas hacia el polo contrario, separándose unos de otros en función de la distinta velocidad de migración, el desplazamiento de los componentes depende de: la carga de la sustancia, el voltaje creado y el coeficiente de fricción entre el soporte y la sustancia depositado en el mismo (27).

La tinción con Bromuro de Etidio por ser una sonda fluorescente tras su iluminación con luz UV, es un medio generalizado de detección de fragmentos de DNA, la sonda se intercala entre la doble hélice del DNA y emite luz. Es por ello que se usa como marcador del DNA para ver presencia y concentración. Se tiene que manejar con precaución ya que es carcinogénico, teratogénico y mutagénico⁶ (28, 29).

1.3 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE PCR Y DNA MITOCONDRIAL

1.3.1 Métodos para la identificación de especies

En años recientes, se ha puesto mucha atención hacia la comprensión de las bases del DNA, cada dato obtenido ha sido fiable, sensible y rápido por muchos aspectos para obtener avances en la autenticación de alimentos. Entre ellos se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que es indudablemente la técnica genética más común usada para el rastreo de especies de origen alimentario (30).

En el caso de la leche, se sabe que tiene un gran número de células somáticas que contienen DNA genómico conveniente para su amplificación por PCR (31). También se sabe que las células somáticas presentes en la leche persisten durante su fabricación y proceso de maduración. Los protocolos reportan, que una extracción del DNA genómico obtenido inmediatamente después de la elaboración del queso se puede usar como una plantilla de DNA para ser amplificación por PCR, pero necesita de mucho cuidado comparada con las plantillas descritas por otros alimentos como lo son la carne ó el pescado cuyo DNA no se degrada tan rápido como pasa con el DNA del queso que corre el riesgo de no replicarse durante la PCR si es que contiene en el alguna plantilla que sea de nuestro interés (32). En caso de que los productos hayan sido adulterados con otra especie ya sea por adición o sustitución parcial o total esta se puede encontrar en la plantilla del DNA del producto por medio de la amplificación por PCR usando los “PRIMERS” apropiados y 29electroforesis.

⁶ Ver tema 2.5 en donde se detallan imágenes y pasos de una evaluación de PCR.

Algunos métodos enfocados a el sondeo de características específicas de las especies son los análisis por proteínas y últimamente el análisis de DNA.

1.3.1.1 Métodos basados en proteínas

Las proteínas han sido usadas como marcadores de especies, no solo para la identificación de especies de consumo humano, si no también para propósitos taxonómicos. La separación de proteínas hidrosolubles por electroforesis de agarosa o almidón podrían ser usadas para este propósito (como lo recomienda la norma para leches y productos lácteos). Las técnicas de electroforesis han ido mejorando con el desarrollo del enfoque isoelectrico y la alta resolución de las proteínas hidrosolubles las cuales permiten la diferenciación de especies (33). Sin embargo, en procesos a altas temperaturas las proteínas comienzan a desnaturalizarse progresivamente y por lo tanto se tiene mayor dificultad para extraerse y las bandas de las proteínas en la electroforesis son casi imperceptibles o se pierden caracterizando estructuras finas (34).

La determinación de proteínas por micro Kjeldhal es otro de los métodos recomendados por norma, y se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico (6).

Otro método para cuantificar proteínas es el de inmunoensayo, que se ha aplicado con éxito para detectar la adulteración de leche (35). La mayoría de los inmunoensayos utilizan anticuerpos que se activan en contra de las proteínas abundantes de la leche como lo son las caseínas y las lactoglobulinas (36).

1.3.1.1.2 Ventajas y desventajas de las técnicas basadas en proteínas

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es la técnica electroforética más común usada para estudiar las proteínas de soya, y esta tiene la ventaja de no afectar los resultados por el procesamiento de los alimentos en estudio, específicamente el tratamiento al calor. A veces, los resultados son muy difíciles de cuantificar y la técnica consume bastante tiempo (11).

En el análisis de alimentos, el ensayo de enzimas inmutosorbentes (ELISA), es la forma de inmunoensayos mas usada por que reduce el costo en equipos sofisticados y es fácil de usar, es rápida y de pronta automatización. Se han reportado un número de inmunoensayos de enzimas para la autenticación de especies en leche y queso (3).

En general las ventajas y desventajas que presentan las técnicas basadas en proteínas son:

Ventajas:

- La rapidez del análisis de las muestras
- El bajo costo de los reactivos
- Amplia disponibilidad de datos para muchas especies

Desventajas:

- ✗ No es posible en ocasiones analizar muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos
- ✗ El análisis de los perfiles electroforéticos es bastante complejo
- ✗ Las muestras deben de estar en buenas condiciones
- ✗ El contenido de proteínas y tipo son específicas del tejido que se estudie (37, 38).

1.3.2 Técnicas basadas en ácidos nucleicos

Entre las más recientes técnicas usadas para controlar las características de calidad y autenticidad de los alimentos esta la Reacción en Cadena de la Polimerasa, que es un técnica genética comúnmente conocida como “huella digital del DNA” (39).

1.3.2.1 Ventajas y Desventajas de la PCR

Ventajas:

- Se requiere de muy poca cantidad de muestra (.125g)
- Se pueden analizar muestras conservadas en mal estado por mucho tiempo
- Es posible analizar muestras sometidas a intensos procesos térmicos
- El DNA es el mismo en todos los tipos de células de un organismo
- Permite la amplificación y el análisis de fragmentos de DNA seleccionados en un tiempo relativamente corto
- El DNA es más estable que las proteínas, y contiene más variabilidad genética y además no contiene intrones (37,40).

Desventajas:

- ✗ El análisis es relativamente costoso
- ✗ Es una técnica un poco más compleja y requiere de personal especializado (37,40).

1.3.3 DNA Mitocondrial.

1.3.3.1 Mitocondria

La mitocondria, ausente en los procariotas, es un orgánulo limitado por una pared de doble membrana. A partir de la fosforilación del Adenodin Difosfato (ADP), transforma la energía liberada por el catabolismo aerobio de distintos nutrientes en ATP, reacción durante la cual se produce H₂O y CO₂. Produce la mayor parte de la energía necesaria para el desarrollo

normal de las distintas funciones celulares. Otro orgánulo, el peroxisoma, también produce energía por catabolismo oxidativo, pero en forma de calor. La mitocondria interviene junto con el REL, en la síntesis de esteroides y de fosfolípidos (41).

El tamaño de las mitocondrias es variable. En la mayor parte de las células, adquieren la forma de pequeños bastones de entre 0.5 y 1µm de diámetro, pudiendo alcanzar una longitud máxima de 7µm. Sin embargo el tamaño y también el número dependen de la actividad de la célula. Con frecuencia las mitocondrias se distribuyen de manera uniforme en el citoplasma; sin embargo su distribución puede no ser uniforme y en algunas células depende de las necesidades energéticas locales (41).

1.3.3.2 mtDNA

El mtADN (DNA mitocondrial) puede observarse con microscopía electrónica. Es circular y tiene la forma de una curva cerrada. Su longitud es de 16kb en la especie humana. El mtDNA representa entre el 1 y el 5% del ADN celular total. El genoma mitocondrial es funcionalmente diferente al nuclear (41).

El genoma mitocondrial consiste de una doble cadena de DNA circular en la que se encuentra la codificación de algunas subunidades que participan en la producción de energía y en el transporte de electrones que se encuentra en la mitocondria (cadena respiratoria y fosforilación oxidativa). Con pocas excepciones, todas las especies eucariotas tienen mitocondria. El genoma mitocondrial de los animales y de las plantas es conocido por desarrollarse a diferentes velocidades. El típico mtDNA de los animales tiene una elevada tasa de mutación y una excepcional economía organizacional, con pocos segmentos no-codificables. En contraste, los genomas mitocondriales tienen en las plantas un largo e importante segmento no codificable y una baja acumulación de diversidad. La aceleración evolutiva del mtDNA (y también de ciertas especies fungí y protistas) implica la importancia en la variación de la secuencia, que se podría encontrar en especies relativamente cercanas

como un rasgo característico en los procedimientos para la identificación de especies. Además, en muchas especies, el mtDNA es inherentemente imparentable sin la recombinación, un efecto de la ayuda que simplifica la interpretación de resultados. El mtDNA es también fácil de recuperar de bajas cantidades y/o muestras de DNA degradadas desde que este se presenta en muchas copias por célula, previendo de una clara ventaja sobre los métodos basados en el genoma nuclear (42).

La limitación más importante del uso de la información del mtDNA en la definición de especies es la supuesta incidencia del gen macho-predisuesto a fluir entre especies (en casos en donde el mtDNA es heredado maternamente) (42).

En la figura 4 puede verse el esquema de un mtDNA, con todas sus regiones diferenciadas que representan los genes (43). Consta de un solo cromosoma, dotado de una molécula cerrada circular de dos hebras de DNA enrolladas entre sí. Su tamaño es pequeño, aproximadamente 8000 veces menor que el tamaño medio del DNA de un cromosoma nuclear. Con aproximadamente un tamaño de 16 569 pares de bases (pb) (44). Este DNA codifica 37 genes que corresponden a los ARN ribosómicos (rARN) componentes de los ribosomas mitocondriales (rRNA 12S y 16S), 22 ARN de transferencia (tARN), empleados en la transducción de los ARN mensajeros (ARNm), y 13 proteínas componentes de los complejos respiratorios de la mitocondria (sistema OXPHOS). Estos complejos están formados por una serie de polipéptidos codificados tanto por el ADN nuclear como por el mitocondrial. De modo que el complejo I (NADH: ubiquinona óxido-reductasa) está formado por unos 40 polipéptidos de los cuales siete están codificados por el ADN mitocondrial (ND 1, 2, 3, 4L, 5, 6); el complejo II (succinato: uniuquinona óxido-reductasa) contiene 4 polipéptidos todos ellos de origen nuclear; el complejo III (ubiquinol: citocromo c óxido-reductasa) tiene unos 10 polipéptidos con solamente uno de ellos, el apocitocromo b (Cytb), de origen mitocondrial (ATPase 6 y 8) (45).

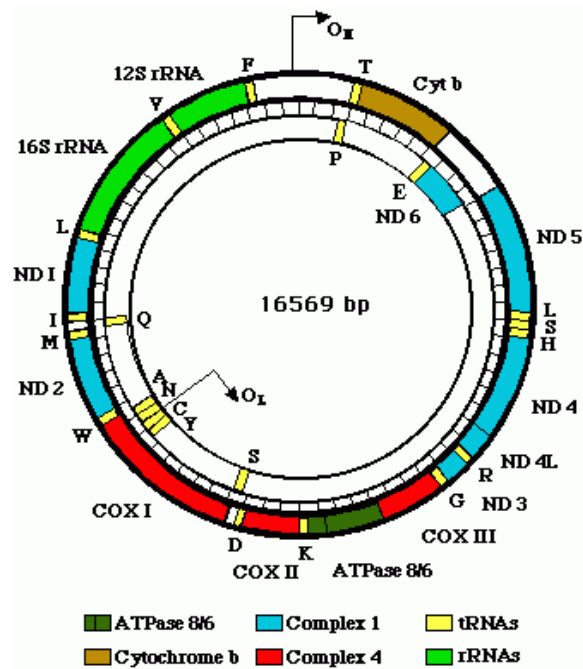


Fig 4. Regiones del mt DNA humano (44)

1.3.3.3 Cyt b

El citocromo b mitocondrial es la única subunidad de la ubiquinol: citocromo c reductasa (complejo bc_1) que está codificado en el ADN mitocondrial. El citocromo b contiene 2 grupos hemo en doble coordinación con histidina que están directamente involucrados en la transferencia de electrones desde el ubiquinol a los otros citocromos de la cadena respiratoria (46). El Citocromo b es el único del Complejo de proteínas III que codifica por el genoma mitocondrial⁷ (47).

⁷ Para este trabajo de investigación los “PRIMERS” se seleccionaron del cyt b del trigo y una parte de cyt b y otra de cox 6 para soya.

CAPITULO II. *METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y PLANTEAMIENTO DEL PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE SOYA Y TRIGO EN QUESO Y EN LECHE LIQUIDA Y EN POLVO*

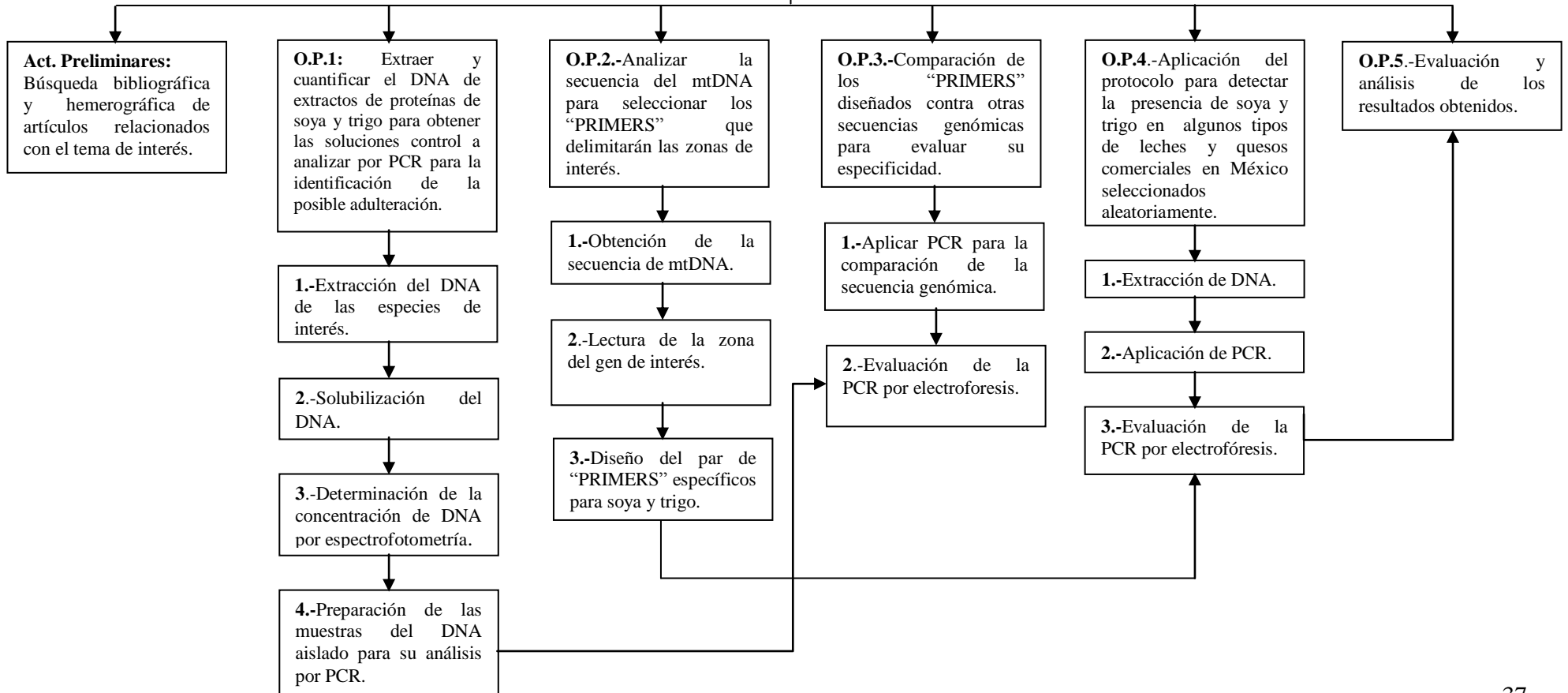
Metodología experimental

2.1 Cuadro Metodológico

Problema: Los aislados proteínicos vegetales son empleados como complementos para enmascarar la falta de características deseadas en algunos productos lácteos.

Hipótesis: Si los extractos y aislados proteicos que se utilizan en algunos productos lácteos no son 100% puros, entonces se encontrará en ellos presencia de DNA residual de los extractos proteínicos de origen no lácteo como pueden ser proteínas de Soya o Trigo para ser amplificado por método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en leches y quesos que los puedan contener.

Objetivo general: Desarrollar un protocolo con PCR para detectar posibles adulteraciones con distintas especies (Soya: *Glycine max*) y/o Trigo: *Triticum aestivum*) en leches y quesos comerciales en México aplicando el PCR.



2.1.1 Descripción del cuadro metodológico

Problema

“Los aislados proteínicos vegetales son empleados como complementos para enmascarar la falta de características deseadas en algunos productos lácteos”.

Hipótesis

“Si los extractos y aislados proteicos que se utilizan en algunos productos lácteos no son 100% puros, entonces se encontrará en ellos presencia de DNA residual de los extractos proteínicos de origen no lácteo como pueden ser proteínas de Soya o Trigo para ser amplificado por método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en leches y quesos que los puedan contener”.

El objetivo general del presente trabajo de investigación fue diseñar un protocolo para detectar la posible presencia de especies vegetales (soya y trigo) en productos comerciales que por su naturaleza no los deberían de contener, pero que sin embargo, la avanzada tecnología de alimentos y el desarrollo de productos de bajo costo que son usados para simular ciertas características no deseables en algunos lácteos que se sabe son adulterados con el fin de cubrir otros fraudes para el rendimiento del producto o bien para dar características o sabores requeridos que le permitan al producto procesado cumplir con las especificaciones químicas y fisicoquímicas que establece su respectiva norma.

Objetivo general

“Desarrollar un protocolo con PCR para detectar posibles adulteraciones con distintas especies (Soya: *Glycine max*) y/o Trigo: *Triticum aestivum*) en leches y quesos comerciales en México aplicando el PCR”.

Objetivo Particular 1

- Extraer y cuantificar el DNA de los extractos de proteínas de soya y trigo para obtener las soluciones control a analizar por PCR para la identificación de la posible adulteración.

El método de extracción es el de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico, el DNA extraído se precipita con etanol frío y se solubiliza con agua ultra desionizada o bidestilada y se mide su concentración en ng/μL con un espectrofotómetro que evalúa la absorbancia a 260nm y la convierte a ng/μl. Ver tema 2.3.

Objetivo Particular 2

- Analizar la secuencia del mtDNA para seleccionar los “PRIMERS” que delimitaran las zonas de interés.

Las secuencias del mtDNA completas se pueden encontrar en paginas bioinformáticas en donde se selecciona una región y rango de interés para delimitar sus “PRIMERS” frontal y reverso. Su diseño gira de acuerdo a las especificaciones que señala la Tabla 2. Ver tema 3.1.2.1 en donde se desarrolla el método para el diseño de “PRIMERS”.

Tabla 2. Diseño de “PRIMERS”: propiedades de los Oligonucleótidos que influyen la eficiencia de amplificación. POPPING, B. “The application of biotechnological methods in authenticity testing”. *Journal of biotechnology*. 98. (2002) 107-112. (48).

<i>Propiedad</i>	<i>Diseño óptimo</i>
Composición de las bases	El contenido de G + C debe de estar entre un 40 y 60% en la secuencia. Las cuatro bases deben de estar distribuidas a lo largo de la secuencia.
Longitud	La secuencia del “PRIMER” complementario a la plantilla de DNA debe ser de 20 a 40 nucleótidos de largo. Así pues, es recomendable que el par de “PRIMERS” sea de la misma longitud o, en todo caso, no rebase una diferencia de 3 nucleótidos.
Secuencias repetidas y complementarias a sí mismas	No deben presentarse secuencias repetidas en la secuencia invertida (secuencia complementaria) o secuencias complementarias entre “PRIMERS” que sean mayores a 3 pares de bases de longitud. Las secuencias de este tipo tienden a formar estructuras tipo horquilla las cuales si son estables bajo las condiciones de PCR. Pueden afectar la hibridación (annealing) del oligonucleótido con su plantilla.
Complementariedad entre los miembros	Las secuencias terminales en 3’ de un “PRIMER” no deben ser capaces de unirse a cualquier secuencia del extremo del otro “PRIMER” debido a que los “PRIMERS” se presentan en altas concentraciones en PCR aún teniendo una débil complementariedad

de un par de “PRIMERS”	entre ellos permite la formación de híbridos y consecuentemente, la síntesis y la amplificación de dímeros de “PRIMERS”. Si se forman prematuramente en el PCR, pueden competir por la DNA polimerasa, “PRIMERS” y nucleótidos, por lo que pueden afectar el amplificado dentro de la plantilla de DNA.
Temperatura de fusión T_m	La T_m calculada para ambos miembros del par de “PRIMERS” no debe diferir en 5° o más. La T_m del producto amplificado no debe diferir por más de 10°C con los valores de T_m del par de oligos. Esta propiedad asegura que el producto amplificado será eficientemente desnaturalizado durante cada ciclo de PCR.
Terminación en 3’	La naturaleza del final 3’ de los “PRIMERS” es crucial. Si es posible, la base en 3’ debe ser G o C. Sin embargo los “PRIMERS” con la secuencia AAGC ó AAGC a su final 3’ no son recomendados debido al inusual alto ΔG de las bases GC terminales, lo que propicia la formación de horquillas y puede generar dímeros de “PRIMERS”.
Localización en sitios de amplificación	Dependiendo del propósito del experimento, la localización de los sitios de amplificación puede estar encerrado por la localización de mutaciones, sitios de restricción, secuencias codificantes o microsatelites.

Objetivo Particular 3

- Comparación de los “PRIMERS” diseñados contra otras secuencias genómicas para evaluar su especificidad.

Para lograr definir su especificidad se emplean programas bioinformáticas o PCR y gel de electroforesis. Ver tema 3.1.3.

Objetivo Particular 4

- Aplicación del protocolo para detectar la presencia de soya y trigo en algunos tipos de leches y quesos comerciales en México seleccionados aleatoriamente.

Extracción del DNA de los productos comerciales y aplicación de PCR. Ver temas: 2.3.2, 2.5 y 3.1.4

Objetivo Particular 5

- Evaluación y análisis de los resultados obtenidos. Ver 3.3

2.2 Materiales y equipos

2.2.1 Muestras requeridas

- ⊕ Muestras de proteína aislada de soya y de trigo
- ⊕ Harinas de soya y trigo
- ⊕ Productos comerciales de Leche en polvo y líquida para el “análisis de leches”
- ⊕ Productos comerciales de quesos tipo panela y manchego para el “análisis de quesos”

2.2.2 Reactivos

****Extracción de DNA**

- Etanol frío
- Mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico, en proporción 25:24:1
- Enzima proteasa a concentración 20 mg/mL
- Solución de lisis (Tris base 50mM, pH=8, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%)
- H₂O desionizada o bidestilada con pH=7

****PCR**

- H₂O libre de nucleasas
- PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA Polimerasa, 400µM de cada dNTP y 3 µM de MgCl₂)
- “PRIMERS” Frontal y Reverso disueltos en agua bidestilada.

****Electroforesis**

- Agarosa en polvo

- Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8
- Bromuro de Etidio en concentración 10mg/mL
- Marcador de peso molecular de 100pb DNA ladder
- Tinte cargador azul/naranja 6X

2.2.3 Equipos

**Extracción de DNA

- Balanza Analítica Electrónica Symmetry Cole-Parmer modelo PR 410
- Mezclador Vortex Apollo modelo SO100
- Centrífuga Mini Spin plus Eppendorf modelo F-45-12-11
- Baño seco modelo DB-006
- Espectrofotómetro Nano Drop modelo ND-1000
- Purificador de Agua millipore modelo CDUFB1001
- Micropipetas
- Autoclave

**PCR y electroforesis

- Mezclador con control de temperatura Termomixer compact 2x F1.6A
- Termociclador Apollo modelo ATC 401
- Termociclador Perkin Elmer Gen Amp PCR System 2400
- Microcentrífuga Wigen Hauser modelo MC6400
- Horno de microondas Servi plus Mabe modelo X01000MDSS
- Cámara de electroforesis horizontal Apollo Modelo 75.710
- Fuente de poder Bio Rad Power Pac 1000
- Transiluminador ultravioleta
- Equipo de fotografía para luz UV

2.3 Métodos

2.3.1 Extracción de DNA

Extracción de DNA. Protocolo modificado al descrito por Sambrook, J. (2001)⁸.

Extracción con Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico

Disgregación de la muestra

1.- Pesar 0.125g de muestra en un tubo Eppendorf etiquetado



Imagen 1. Muestras etiquetadas para extracción de DNA

2.-Adicionar 1250 μ L de solución de lisis según lo descrito en 2.2.2.



Imagen 2. Adición de solución de lisis con micropipeta

3.-Mezclar con vortex hasta que se logre una homogenización apropiada.

⁸ El DNA es sumamente susceptible a daño por unas enzimas llamadas las DNAasas, las cuales se pueden encontrar en muchos lugares de contacto como las manos, el equipo, las soluciones, etc. Es por ello que el área de trabajo donde se maneja este material, así como la persona que lo va a manejar debe tener una limpieza apropiada, usar bata y guantes y al regresar al área de trabajo cambiarse los guantes, todo debe de ser estéril y preferiblemente desechable (19).



Imagen 3. Mezclador vortex

4.-Adicionar 7 μ L de enzima proteinasa K previamente concentrada a 20mg/ml

5.-Incubar las muestras a 50°C en baño seco por 2 horas



Imagen 4. Baño seco

6.-Desactivar la enzima manteniendo la temperatura a 60°C por lo menos 1 hora.

Extracción de proteínas y polisacáridos.

1.-Adicionar al tubo que contiene la muestra 250 μ L de la mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico

2.-Mezclar el tubo varias veces suavemente

3.-Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente



Imagen 5. Centrifuga Mini Spin

4.-Separar las fases, recuperar la fase acuosa superior que contiene el DNA. Evitar recuperar cualquiera de las otras fases.

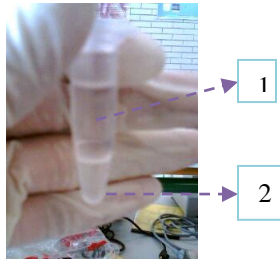


Imagen 6. Separación de fases 1 y 2.

5.-Trasladar la fase recuperada a 2 tubos eppendorf nuevos.



Imagen 7. Autoclave para esterilizar el material (puntas y tubos eppendorf)

*Precipitación del DNA

1.-Adicionar 1500 μ L de Etanol frío a la fase recuperada

2.-Mezclar suavemente

3.-Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente

4.- El DNA debe visualizarse pegado al tubo como un precipitado compacto. Decantar el Etanol y dejar secar el DNA en baño seco a 31°C



Imagen 8. Precipitación de DNA

5.- Una vez eliminado el Etanol, se adiciona 100 μ L de H₂O bidestilada para resuspender el DNA y agitar suavemente el tubo⁹.

⁹ Cuando la disolución presenta partículas insolubles, se reintenta la extracción de proteínas y polisacáridos con Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico y se vuelve a lavar con Etanol, se recomienda no hacer más de 3 lavados ya que se daña demasiado el DNA y se corre el riesgo de que no amplifique; no siempre se observa el DNA como una mancha blanca pero eso no significa que no se encuentre en el tubo.

2.3.1.1 Cuantificación de DNA

CUANTIFICACIÓN POR MEDICIÓN DE ABSORBANCIA A 260 nm

Se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de DNA con proteínas. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una unidad de densidad óptica corresponde a aproximadamente 50 μ g/mL de DNA de doble hebra. La relación entre las lecturas a 260/280nm proporciona un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. Preparaciones puras de DNA tienen valores de 1.8, mientras que valores de 2, muestran la existencia de preparaciones puras de RNA. Si existe contaminación significativa con fenol o proteínas, la relación 260/280nm será menor de 1.8 (13, 49).

El equipo utilizado para esta lectura fue el NanoDroop ND-100, que usa tecnología de fibra óptica y tensión superficial, la muestra se coloca en un punto entre dos superficies ópticas que definen la longitud en orientación vertical. Durante ciclo de medición toma dos lecturas primero a 1mm y después a 0.2mm (50). Este equipo y su software de trabajo proporciona con 2 μ L de muestra la absorbancia a 260nm el cociente 260/280 y además calcula la concentración de DNA en ng/ μ L.

1.-Para cargar el equipo limpiar y adicionar 2 μ L de H₂O libre de nucleasas al lector del espectrofotometro y bajar el brazo cuidadosamente. Seleccionar en el programa NanoDroop el icono correspondiente a ácidos Nucléicos (Nucleic Aci) y cargar 2 μ L de H₂O libre de nucleasas.

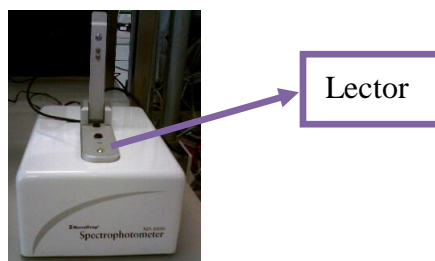


Imagen 9. Espectrofotometro NanoDroop

2.-Limpiar el lector y adicionar nuevamente 2 μ L de H₂O libre de nucleasas para calibrar el equipo y seleccionar en el monitor el botón de Blanco (blank).

3.-Para tomar la lectura de nuestra muestra limpiar y adicionar 2 μ L escribir el nombre de la muestra y seleccionar el botón de medir (Measure) del menú de opciones.

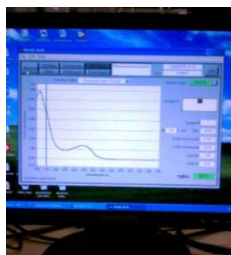


Imagen 10. Lectura de datos

Los datos se visualizan en pantalla.

2.3.1.2 Amplificación de DNA (Preparación de la reacción)

La preparación de las muestras para la reacción se prepara de acuerdo con el protocolo que precisa Promega kit de PCR.

Los “PRIMERS” que se usaron para este proyecto se mandaron a hacer a un laboratorio de “Invitrogen”, se solubilizaron a una concentración final de 250 μ M con H₂O bidestilada y se dejaron en un Termomixer compact a 350 rpm por un espacio de 3 horas a 37°C, finalmente se diluyeron a una relación 1:10 con H₂O bidestilada.



Imagen 11. Mezclador con control de temperatura Termomixer

PCR 25 μ L

1.-

Tabla 3. Componentes de la PCR, preparación de la reacción

Master Mix	12.5 μ L
Primer F	.5 μ L
Primer R	.5 μ L
DNA	1-5 μ L
H ₂ O libre	La necesaria
de	para completar
nucleasas	25 μ L

2.- Preparar según lo especificado en la tabla 3 un tubo con todas las cantidades requeridas según el número de muestras (excepto el DNA), mezclar con un pulso en la microcentrífuga y repartir equitativamente entre el número de tubos para cada muestra.

4.-Agregar a cada tubo su correspondiente de DNA y etiquetar

5.-Mezclar en micro centrífuga y llevar al termociclador

6.-Programar el termociclador



Imagen 12. Termociclador Perkin Elmer Gen Amp

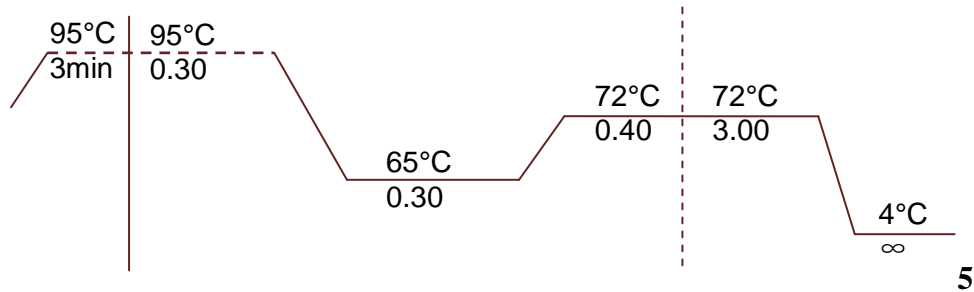


Imagen 13. Termociclador Apollo

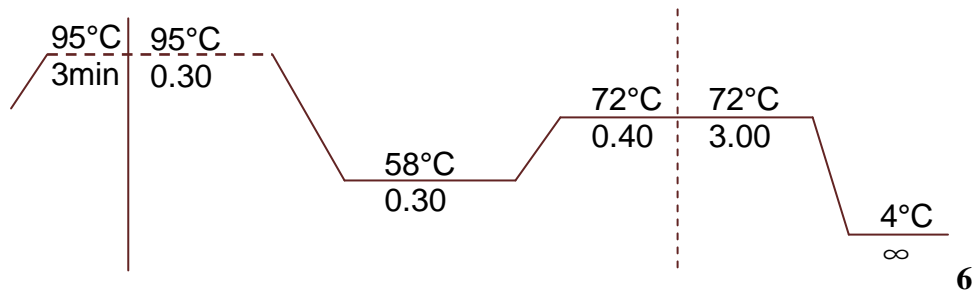
2.4 Programación del termociclador

Se programa según la temperatura media de los cebadores (“PRIMERS”) y la enzima del “Master Mix”, los tiempos y números de ciclo son según la referencia bibliográfica base o los resultados obtenidos según la experimentación.

Programa para soya:



Programa diseñado para Trigo:



Figuras 5 y 6. Esquematización de los programas utilizados en el termociclador

2.5 Evaluación de PCR

2.5.1 Preparación del gel de Agarosa

Preparación del gel de agarosa y electroforesis

La concentración del gel depende del tamaño de la amplificación, cantidades pequeñas se preparan a concentraciones elevadas de agarosa y viceversa.

- 1.-Se prepara un gel de agarosa al 2% con TAE 1X y se calienta en microondas hasta que sea una solución transparente, dejar enfriar lo suficiente antes de realizar el siguiente paso.
- 2.-Agregar una gota de Bromuro de Etidio
- 3.-Sellar perfectamente la caja para el gel y colocar el peine. Vaciar la solución cuidadosamente y con cuidado de no formar burbujas, una vez llena la caja dejar solidificar el gel.

4.-Colocar el gel en la caja para electroforesis y cubrir con TAE 1X

2.5.2 Carga y corrida del gel de agarosa por Electroforesis Horizontal

1.- En un trozo de parafilm adicionar por número de muestras + marcador + blanco¹⁰:

Tabla 4. Cantidades para cargar el gel de electroforesis

3μL de Bromuro de Etidio
3μL de blue Orange
5μL de marcador de peso molecular (solo para El primer carril)
5μL de muestra

El tiempo que se deja correr el gel, depende del tamaño de banda de los “PRIMERS” utilizados.

En la imagen 14 se muestra el marcador de peso molecular de DNA (100bp DNA ladder marca Promega) de 100 pares de bases que se utilizó como referencia en todos los geles.

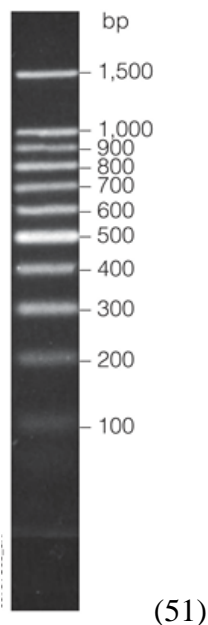


Imagen 14. 100pb DNA ladder

¹⁰ Es mejor colocar en el parafilm la cantidad de Bromuro de Etidio y Blue Orange necesarios por muestra y después por separado adicionar el DNA.

2.- Cargar el gel poniendo 3 μ L de Bromuro de Etidio, 3 μ L de Blue orange y 5 μ L del maracdor de peso molecular solo para el primer carril y 5 μ L de muestra en el resto de los pocillos.

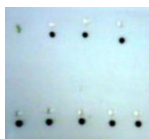


Imagen 15. Bromuro de Etidio y blue orange en parafilm

El Bromuro de Etidio es un colorante fluorescente altamente tóxico esencial para la tinción de DNA en el gel. Esta molécula se intercala entre las bases apiladas del DNA creando una unión del tipo Van der Waals con las bases de la cadena. Después de la inserción dentro de la hélice, el colorante permanece perpendicular al eje helicoidal teniendo contacto con la base superior e inferior. La posición arreglada de la molécula y su proximidad a las bases causa que el colorante exhiba un campo fluorescente (52).

Este componente es el buffer de carga del gel, que se mezcla con las muestras antes de cargarlas. Tiene 3 propósitos: 1) incrementar la densidad de la muestra, 2) Asegurar que el DNA descienda uniformemente dentro del pocillo y 3) Añadir color a la muestra, con lo que se simplifica el proceso de carga. Este compuesto contiene colorantes que migran hacia el ánodo en un campo eléctrico (52).

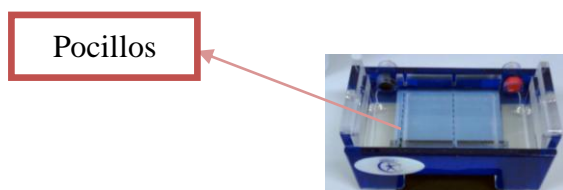


Imagen 16. Caja de electroforesis con el gel de agarosa dentro

3.- Tapar y conectar los electrodos (- +)

4.- Programar la fuente de poder a 90V y correr

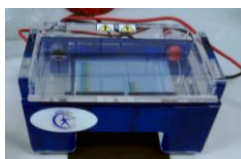


Imagen 17. Electroforesis corriendo



Imagen 18. Fuente de poder

2.5.3 Fotografía del gel

- 1.-Sacar y escurrir bien el gel de la caja de electroforesis con cuidado de no romperlo.
- 2.-Colocar el gel cuidadosamente dentro del transiluminador, cerrar la puerta y encender el equipo.
- 3.-Enfocar el gel y tomar la fotografía.

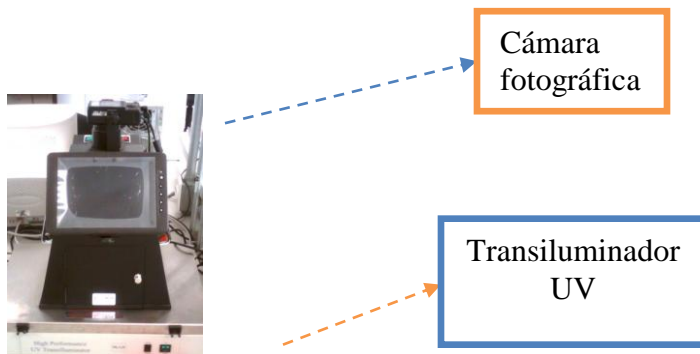


Imagen 19. Cámara y transiluminador UV

CAPITULO III. *DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS*

3.1 Resultados por objetivo

3.1.1 Objetivo particular 1. Extracción y cuantificación del DNA de proteína aislada de soya y trigo

En la siguiente tabla se aprecian los resultados obtenidos en el nanodroop para el cálculo de la concentración de DNA en los extractos proteicos de soya (PAS) y trigo (PT).

Tabla 5. Extracción de DNA de proteína aislada de soya

Nombre de la muestra		
PAS	$260/280 = 1.96$	
	$\text{Ng}/\mu\text{L} = 60.2$	

Tabla 6. Extracción de DNA de proteína de Trigo (gluten)

Nombre de la muestra		
PT	$260/280 = 1.84$	
	$\text{Ng}/\mu\text{L} = 149.6$	

Con los resultados de la concentración de ácidos nucleicos en las proteínas aisladas de soya y de trigo (según lo especificado en el tema 2.3.1) se comprueba que dichos extractos posiblemente usados como adulterantes en leches y quesos procesados, no son 100% puros, pues en ellos encontramos trazas de DNA de soya y trigo que pudiera ser localizado en leches y quesos comerciales, sabiendo que la PCR detecta DNA y no proteínas. De esta manera se logró confirmar la hipótesis propuesta, que permitió seguir con el proyecto de detección de adulteración con especies vegetales en productos comerciales de quesos y leches líquidas y en polvo.

3.1.2 Objetivo particular 2

3.1.2.1 Selección y diseño de “PRIMERS”

Para la soya se decidió utilizar la pareja de “PRIMERS” propuesta por Kanasawa Akira y colaboradores (referencia 53) que se han modificado para trabajos de investigación anteriores como el Trabajo de tesis de licenciatura de Carbonell Guadarrama Nancy (referencia 34).

La secuencia de estos “PRIMERS” hibrida en regiones del gen *cox2* y *atp6* del DNA mitocondrial y permite obtener una amplificado de 305 pares de base (pb) que se muestran a continuación:

- PRIMERS Frontal y Reverso de soya

Soy F

5´ AGCGGGTAGAGTAATTGGTC 3´

Soy R


5´ CAAGGAGCAATCGTGAGGAATAG 3´

Estos cebadores se mandaron a hacer a un laboratorio de INVITROGEN.

En la Figura 7 se muestra parte de la secuencia del DNA mitocondrial del trigo (*Triticum aestivum*), que corresponde al gen del Citocromo b (Cyt b). La zona sombreada de azul corresponde a la secuencia seleccionada para amplificar, y en rojo están marcados los PRIMERS frontal y reverso que se diseñaron para este proyecto.

- PRIMERS Frontal y Reverso de Trigo

Región Cyt b 

Posición del PRIMER frontal: 63341-63360 

Posición del PRIMER reverso: 63980-63961 


Tamaño= 640pb 

Fig. 7. Diseño de “PRIMERS”

63121	gctatggcca	aaaggatccg	gtgcatgag	tctcatccgt	gtaatat	ggaattcctc
63181	ttccaactcg	tcccggaatg	ggcggtatgg	caaagaacaa	gaagaaaaag	acagaaggaa
63241	tttgtccaat	agtaacaaat	ggcgctcca	caggttgaca	tccgatccaa	cctagtagta
63301	agcaatccgc	caaaagcaac	caaaatattc	cttggtgaat	cggtcgaaaa	cctgaactac
63361	gcacatacat	ttctttaaaa	aaaggtaaag	ccaagagaga	tataaaaact	ggtgctattg
63421	cggtacacc	tcccgccttg	tcaggtatac	tgccaagaat	ggcatggatc	ggtaggaat
63481	accattccgg	cacaatatga	ggcggggtgg	gcatcggatt	agcaggtata	taattgtcgg
63541	gatgcccaca	aacattagga	gcaaaaaaaa	tccaaatgga	aaaaaagata	gcagaagcta
63601	cccgaacctac	aagatccttt	acataaaaaat	aagggttaaga	agcaat	tccaatcag
63661	aatgtacacc	caatggatta	tttgatccat	attgatgcaa	tgccggccaga	tgaagaagac
63721	tggcgctac	taaaataaag	gggagtaaat	gatggagact	aaaaaaacga	tttaaggtgg
63781	cattgtccac	ggagaaacca	ccccaaagcc	aagtcactat	ggtatctcct	actactggtta
63841	tggcgctagc	taagcttgta	attactgttg	ctccccaaaa	gctcatctga	ccccaaaggtg
63901	gtacgtatcc	tataaaagct	gtcacaatca	ttaataggaa	tatgacaact	ccgagacacc
63961	gaacaaattc	cctaggactg	ctataactcg	catgatatag	accacgaaaa	atatgaaggt
64021	gaaccacaat	gagaaacata	cttgcccat	tagcatgcat	ataacggagc	aaccagcccc
64081	cttcaacatc	tctcataatg	tgttctacgc	tgttgaaagc	tagatccaca	tgaggtgtgt
64141	gatgcatagc	taaaaaaacg	ccagtcacta	tctgaatgac	taacaaata	cctgctaacc
64201	aaccgaacc	ccaccaataa	ctaagattgc	tgggggttgg	ataatctatc	aaatgctggt
64261	taagtgtgga	gtatataggt	tgtttaagaa	gagagaatcg	tgggttcctt	atagtcattt

Trig F

5' CGGTCGAAAACCTTGAACACTAC 3'

Trig R

5' CAGTCCTAGGGAATTTGTTC 3'

Calculo de Tm: $Tm = (4x[G+C]) + (2x[A+T])^{\circ}C$

Donde G,C,A y T es el número de nucleótidos de cada tipo en el primer.

Tm:

F = 58°C

R = 58°C

El cálculo de la Tm para cada “PRIMER” según la fórmula No 1 fué de 58°C que es apropiado para la PCR.

Ya que idealmente la Tm debe de ser la misma para ambos “PRIMERS” y solo hay 3 hibridaciones que se encuentran en el centro, entonces el diseño es correcto y no debe de haber ningún problema para su amplificación con especies de trigo.

3.1.3 Objetivo particular 3

Especificidad de “PRIMERS” de Soya.

En la Figura 8 se muestra el resultado de la amplificación utilizando los “PRIMERS” y el programa de amplificación para soya.

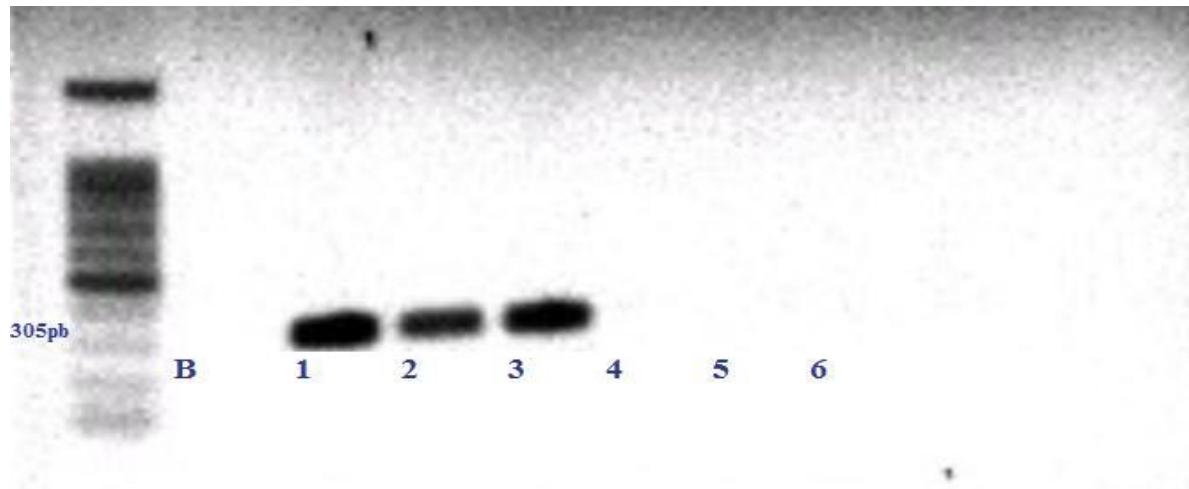


Fig. 8. Especificidad de los “PRIMERS” de Soya

B=Blanco, 1=Leche de soya, 2=Harina de soya, 3=Proteína aislada de soya, 4=Pollo, 5=Trucha, 6=Maíz

Como se observa hay una amplificación intensa en las muestras de leche de soya, harina de soya y proteína aislada de soya, lo que muestra la eficacia de la técnica para diferentes procesamientos de la especie de interés. Así mismo demostramos que no amplifican especies diferentes, pues no amplificó en nada ninguna de las 3 especies filogenéticamente lejanas a las que se les adicionaron “PRIMERS” de soya. (Se utilizó el termociclador Perkin Elmer Gen Amp).

Especificidad de “PRIMERS” de Trigo.

Con el programa bioinformático Blast (54), se procedió a averiguar el porcentaje de identidad de las secuencias de los “PRIMERS” seleccionados para el trigo.

WU-BLAST2 Results

SUBMISSION PARAMETERS			
Title	Sequence	Database	em_rel_std_p.in
Sequence length	75	Sequence type	n
Program	WU-blastn	Version	2.0MP-WashU [04-May-2006]
Number of scores	5	Number of alignments	20
Expected threshold	10	Filter	dust

Alignment	DB:ID	Source	Length	Score	Identity%	Positives%	E()
1 <input type="checkbox"/>	EM_PL:AC006225	Arabidopsis thaliana chromosome 2 BAC T5E7 genomic sequence, complete sequence.	88249	187	77	77	0.33
2 <input type="checkbox"/>	EM_PL:AF325344	Beta vulgaris cytochrome b (cob) gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial product.	2681	168	75	75	2.2
3 <input type="checkbox"/>	EM_PL:EU431224	Carica papaya mitochondrion, complete genome.	476890	169	74	74	2.2
4 <input type="checkbox"/>	EM_PL:BA000009	Beta vulgaris subsp. vulgaris mitochondrial DNA, complete genome.	368801	168	75	75	2.4
5 <input type="checkbox"/>	EM_PL:EU534409	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome.	452526	163	82	82	4.1
6 <input type="checkbox"/>	EM_PL:AP008982	Triticum aestivum mitochondrial DNA, complete genome.	452528	163	82	82	4.1

Imagen 20. Especificidad de los “PRIMERS” de Trigo (54)

Como se puede apreciar se obtuvo el mejor porcentaje de identidad (82%) para las secuencias con mtDNA de la especie de interés para 2 variedades de trigo y de 74-77% para Arabidopsis thaliana, Beta vulgaris y Carica papaya que son especies que por ningún motivo se podrían confundir con trigo ya que su probabilidad de estar contenidas en leches y quesos es muchísimo menor a la de las demás especies vegetales en cuestión, en este caso soya y trigo.

3.1.4 Objetivo particular 4

Aplicación del protocolo a productos comerciales en México de leches en polvo y líquida y quesos manchego y panela. Extracción de DNA del producto, PCR y electroforesis.

La selección de las muestras comerciales se realizó de manera aleatoria en diferentes centros de distribución. Por el costo de la técnica se realizó solo una determinación a cada muestra, siempre utilizando los controles positivos como referencia.

En la imagen 21 se muestran algunas de las marcas de los productos seleccionados, y en la tabla 8 se presentan los valores de la concentración de DNA (ng/ μ L) y la relación 260/280 obtenida de la extracción de DNA y medida en el Nanodrop.



Imagen 21. Productos analizados

Tabla 7. Resultados de la extracción de DNA

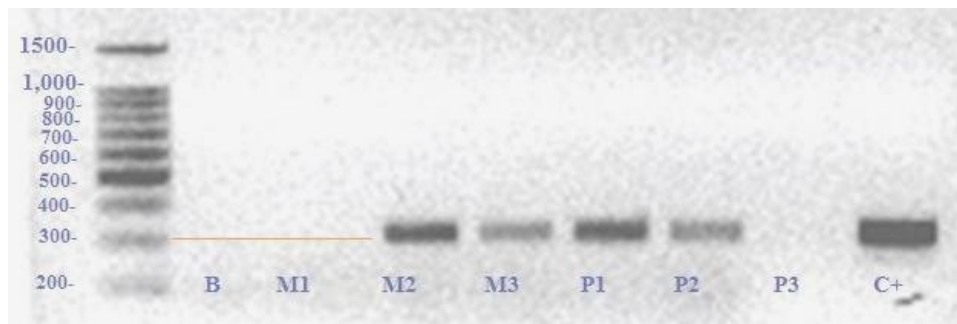
Producto	Marca	260/280	ng/μL
M1	Chalet	1.68	57.1
M2	Buen pastor	1.64	62.9
M3	Chipilo	1.71	187
P1	Los volcanes	1.59	153.6
P2	Chilchota	1.65	114.2
P3	Blue house	1.59	114.2
L1	Lala	1.61	39.5
L2	Liconsa	1.56	72.9
L3	Al día	1.59	54.9
L4	Nutrileche	1.59	55.3
L5	Parmalat	1.59	64.8
L6	Golden Hills	1.6	63.2
L7	Alpura	1.87	129.4
L8	Lala light	1.64	114.8
L9	Monarca	1.61	85.5
L10	Fortileche	1.68	166.1
L11	Nestlé Fitness con cereales	1.48	64.1
Ln1	Promil Gold	1.62	53.1
Ln2	SMA sin lactosa	1.47	46.6
Ln3	Nido	1.68	146.5
Ln4	Nan	1.14	83.9
La5	MacLeche	1.35	174.3
La6	Liconsa	1.48	80.1
La7	Aasha	1.39	61.1
La8	Alpura	1.03	96.3

M= queso manchego, P= queso panela, L=leche líquida, Ln y La= leche en polvo para niño ó adulto.

Presencia de soya en quesos.

En la figura 9 se muestra el amplificado obtenido utilizando los “PRIMERS” y programa de PCR para detectar soya. Como se aprecia varios quesos muestran presencia de la banda de 305pb, que corresponde a la soya, como lo se observa en el carril C+ que es el control positivo usado (DNA de leche de soya)¹¹.

Fig 9 Resultados de detección de presencia de soya en quesos:



B=Blanco, M1=Chalet, M2=Buen pastor, M3=Chipilo, P1=Los volcanes, P2=Chilchota, P3=Blue house

En este primer resultado se obtuvo que en 4 de 6 (quesos M2, M3, P1 y P2) productos comerciales analizados hay presencia de soya, siendo para este caso que el queso cualquiera que sea su tipo no debería de contener otra especie totalmente ajena a los componentes necesarios para su elaboración y que sobretodo estén reportados en la etiqueta, además de que en la mayoría de estos productos ni siquiera se reporta como ingrediente o como una adición de proteínas vegetales a la formulación del producto, con lo que se justificaría de algún modo la presencia de soya en quesos comerciales.

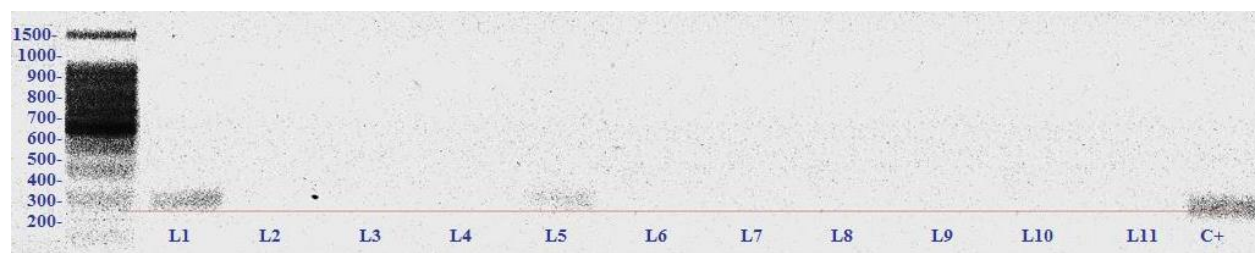
¹¹ En el primer carril de todas las fotografías se encuentra el marcador de peso molecular, que es nuestra referencia para el tamaño de banda de nuestros “PRIMERS” utilizados para cada especie, los números indicados a la derecha indican el tamaño de cada banda y la línea roja señala el tamaño esperado por especie.

Como la PCR es sumamente específica es necesario para ella la adición de solamente 1µL de DNA según los resultados obtenidos (en la mayoría de los casos); sin embargo, en la PCR para quesos se adicionaron 5 µL en vez de 1 µL quedaron algunas dudas en si los productos M1 y P3 en realidad no contenían soya o en si la contenían y no había amplificado, para despejar esta incógnita se preparó otra PCR a 1µL de DNA en donde no amplificó soya en ninguno de los dos productos durante su segundo análisis, dicha fotografía se reporta en anexos.

Presencia de Soya en leche de vaca.

En la figura 10 se observan 2 amplificados, el primero para L1 y el segundo para L5. Esta presencia aparentemente no es en la misma cantidad que en el caso de los quesos, sin embargo esto no justifica de ninguna manera su presencia ya que son productos que se venden como leche y no como fórmula láctea, además de que en sus ingredientes dicen contener proteínas propias de la leche que de alguna forma se podrían intentar sustituir con proteínas vegetales para cubrir otras adulteraciones provocadas para obtener mas rendimiento del producto y su y sobretodo cumplir con los requisitos nutrimentales que se deben de reportar según la NOM-155-SCFI-2003.

Fig 10 Resultados de detección de presencia de soya en leche de vaca:



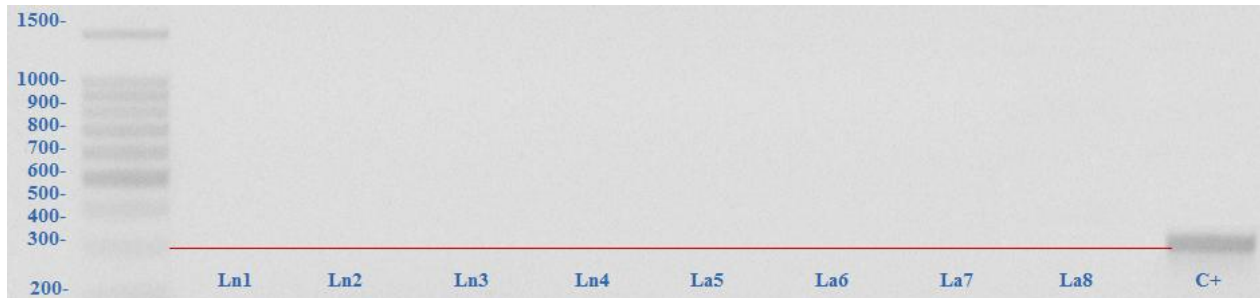
L1=Lala, L2=Liconsa, L3=Al día, L4=Nutrileche, L5=Parmalat, L6=Golden Hills, L7=Alpura, L8=Lala light, L9=Monarca, L10=Fortileche, L11=Néstele Fitness con cereales.

La PCR para estos productos se preparó a 25µL de reacción adicionando 1µL de DNA de muestra, el termociclador utilizado fue el Perkin Elmer Gen Amp.

Presencia de Soya en leche en polvo.

En la figura 11 se observan los resultados de la amplificación utilizando los “PRIMERS” y programa de PCR específico para soya en productos comerciales de leche en polvo. Como se aprecia en la figura, no se obtuvo ningún amplificado en las muestras de productos estudiados.

Fig 11 Resultados de detección de presencia de soya en leche en polvo para n= niño y a= adulto:



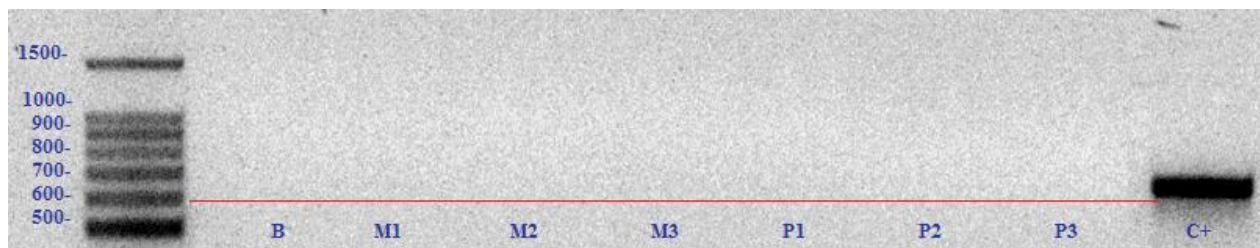
Ln1=Promil Gold, Ln2=SMA sin lactosa, Ln3=Nido, Ln4=Nan, La5=MacLeche, La6=Liconsa, La7=Aasha, La8=Alpura

Para el caso de los productos de leche en polvo analizados, a pesar de que la bibliografía señala que se ha encontrado adulteración con soya en leches en polvo el análisis en estas muestras no refleja su presencia.

Presencia de Trigo en quesos.

La figura 12 muestra los resultados obtenidos de la PCR utilizando los “PRIMERS” y programa específicos de trigo. Como se aprecia, únicamente el control positivo mostró la banda de 640pb esperada, y no fue así para ninguna de las muestras estudiadas.

Fig 12 Resultados de detección de presencia de trigo en quesos:



B=Blanco, M1=Chalet, M2=Buen pastor, M3=Chipilo, P1=Los volcanes, P2=Chilchota, P3=Blue house.

Esto indica que no hay presencia de trigo en estos quesos estudiados.

Presencia de trigo en leche de vaca.

De igual forma que en el caso anterior, en la figura 13 se observa únicamente el amplificado de 640pb solamente en el control positivo y no así en las muestras de leche de vaca estudiadas.

Fig 13 Resultados de detección de presencia de trigo en leche de vaca:

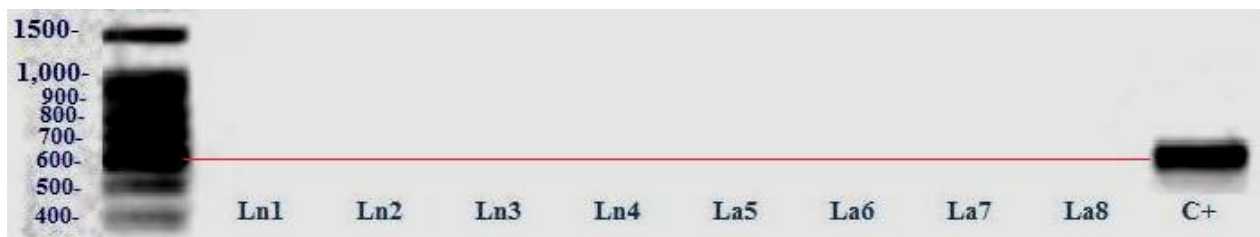


L1=Lala, L2=Liconsa, L3=Al día, L4=Nutrileche, L5=Parmalat, L6=Golden Hills, L7=Alpura, L8=Lala light, L9=Monarca, L10=Fortileche, L11=Néstele Fitness con cereales.

Presencia de trigo en leche en polvo

En la figura 14 se observa únicamente el amplificado de 640pb para el control positivo y no así en las muestras de leche de vaca estudiadas.

Fig 14 Resultados de detección de presencia de trigo en leche en polvo para n = niño y a = adulto:



Ln1=Promil Gold, Ln2=SMA sin lactosa, Ln3=Nido, Ln4=Nan, La5=MacLeche, La6=Liconsa, La7=Aasha, La8=Alpura

La PCR para quesos y leches líquidas y en polvo se preparó a 25 μ L de reacción con 5 μ L de DNA para todos los casos, aquí el control positivo (C+) fue de 1 μ L de DNA de harina de Trigo y los “PRIMERS” diseñados para esta especie tienen un tamaño de banda que amplifica a 640pb como lo indica la línea roja apuntando hacia el control positivo en todas las fotografías de resultados.

En las tres figuras de electroforesis para la visualización del resultado de PCR para quesos y leches líquidas y en polvo no se visualiza presencia de trigo en ninguno de los 25 productos analizados, por lo tanto podemos descartar el uso de esta especie para la adulteración de los productos lácteos estudiados.

3.2 Discusión

La evolución de la biotecnología ha buscado tener resultados más precisos cuando de especies se trata, la Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica de diagnóstico, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un DNA específico (4); dicha técnica resulta de suma utilidad para la detección de sustitución o adulteración de alimentos, entre otros aspectos que agradecen su especificidad como lo muestran los resultados obtenidos en este trabajo.

Se ha señalado que a pesar de la buena nutrición y las propiedades funcionales de la proteína de soya, autoridades de muchos países no dan su autorización legal para el uso de proteínas ajenas a la leche como suplementos de la leche bovina. De hecho el contenido proteico de algunos productos se puede dar sin indicar el tipo de proteína, es el mismo caso para la proteína de trigo en donde el bajo costo de estos productos le permite a la industria lechera emplearlos como agentes adulterantes según lo reportan investigaciones anteriores. Esta adulteración se presenta pues el valor de la leche está relacionado con la calidad proteica, y es posible pensar que en la industria láctea este tipo de aislados proteicos se emplean para cumplir con los niveles requeridos para estos componentes según la composición química y nutricional requerida.

Se ha encontrado que algunos productos lácteos son adulterados con extractos y aislados proteicos de soya y de trigo para lograr, como se menciona en el párrafo anterior, enmascarar la calidad de la leche y el queso, que fueron los productos estudiados para esta investigación.

El riesgo al adulterar con proteínas de soya o de trigo es que estas especies son consideradas como alérgenos secundarios, por lo tanto estar contenidas en los alimentos puede ser un riesgo importante a consumidores intolerantes a estas especies, por lo tanto, hay dos aspectos importantes a destacar, primero, la adición de sustancias ajenas a la proteína propia de la leche, y segundo que estas sustancias agregadas pueden causar daños ó molestias a personas intolerantes a la soya y al trigo, específicamente al gluten.

Es más barato para la industria láctea el uso de proteína de Chícharo, que de igual manera no está permitida pero que sin embargo por su bajo costo es la que más se usa según lo reportan algunas averiguaciones.

Este estudio se enfocó a la detección de soya y trigo por ser considerados alérgenos, independientemente de que el chícharo no entre dentro de esta clasificación, añadirlo en la formulación de la leche y el queso tampoco está permitido además de que para este estudio no encontraron referencias bibliográficas que respalden esta información. Sin embargo sería interesante diseñar un protocolo similar al propuesto en este trabajo, que permita detectar la presencia de extractos proteicos de chícharo en productos lácteos. (En Anexos se proponen algunos pares de “PRIMERS” propuestos para llevar a cabo dicho estudio).

De todos los productos analizados solo se tomo una muestra al azar en el mercado, no se experimento por triplicado, ya que el propósito de este trabajo fue en un principio desarrollar un protocolo que permita la detección de soya y de trigo, considerados alérgenos y que son agregados para enmascarar otras adulteraciones para el rendimiento del producto y para cumplir con las especificaciones requeridas por norma; este estudio no tuvo como objetivo demostrar la presencia de estas especies en los productos, es por eso que no se realizó ninguna prueba por triplicado ni se elaboró una curva de calibración para el análisis de los resultados obtenidos.

El problema y la hipótesis planteados en este proyecto de investigación se dieron respuesta con la experimentación, primero para poder iniciar con el proyecto se tuvo que confirmar la existencia de DNA en extractos proteicos de soya y de trigo empleados en la industria de alimentos, para esto, se utilizó el método de extracción de DNA descrito, una vez confirmado lo anterior, se prosiguió con el proyecto en donde se pudo comprobar la presencia de DNA de soya en algunos productos a los cuáles se les adicionó probablemente este tipo de extracto proteico para enmascarar características deseadas, cubrir otras adulteraciones ó cumplir con las especificaciones requeridas por norma para su comercialización en México (1).

Ya que se demostró que los aislados proteicos en el mercado para la industria, no son realmente puros, pues no debieran contener DNA disponible para su hibridación durante la PCR, se confirmó la robusta y atenta sensibilidad de este método que ha guiado al desarrollo de múltiples protocolos que a su vez explotan los diferentes aspectos y atributos de esta metodología, permitiendo así la identificación de más de una especie en una sola extracción de DNA e incluso en una sola PCR. Por lo tanto, el protocolo para la detección de soya y trigo planteado y propuesto en este proyecto de investigación confirma su validez para proyectos de investigación similares, ya que se ratifica su enorme utilidad y provecho para la detección de estas especies y así confirmar o descartar adulteraciones en productos alimenticios, aunque para cada alimento es necesario corroborar el buen funcionamiento del protocolo, ya que las diversas matrices que estos presentan pueden requerir pequeñas modificaciones en el protocolo.

Cabe mencionar que la adición de 1 μ L ó 5 μ L de DNA depende de la concentración final de DNA obtenida de la extracción y es decisión del experimentador la cantidad a agregar, a pesar de que se ha demostrado que este tipo de reacciones no requieren de más de 1 μ L de DNA, en este estudio se encontró que pueden ser necesarios 5 μ L de DNA, pero que sin embargo la cantidad no garantiza su amplificado durante la PCR; la cantidad recomendada para realizar una amplificación por PCR va de 40 a 100 ng/ μ l (26).

A pesar de que la bibliografía señala que se ha encontrado adulteración con soya en leches en polvo, el análisis en las muestras estudiadas no refleja su presencia en el presente estudio por

PCR, sin embargo se recomienda trabajar con otros métodos de extracción de DNA, o bien, experimentar con técnicas de electroforesis de entre las que se encuentran electroforesis capilar con dodecil sulfato sódico ó SDS-CE por sus siglas en ingles, Electroforesis por Urea poliacrilamida, y ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas ó ELISA que son los métodos reportados por investigaciones anteriores y que han experimentado para la detección de proteína de soya en leches en polvo según lo reportado en las fuentes: 10, 36, 52 y 55.

Dichos métodos se han venido empleado no solo para detección de proteínas en leche en polvo, si no también para una gran variedad de productos alimenticios en donde se busca la presencia de proteínas ajenas a las naturales y que pudieran o no causar algún tipo de daño al consumidor dado su grado alérgico.

Los resultados para leche en polvo presentados en este estudio, hasta no ser comparados con otros que demuestren lo contrario, los presentamos como válidos para la amplificación de DNA de soya y de trigo, ya que se trabajó con parámetros y condiciones distintas para comprobar sus resultados. En virtud de que se realizó la prueba de PCR para leche en polvo encaminada a confirmar la presencia de *Bos taurus* (para confirmar la especie a la que pertenece la materia prima de la muestra), se emplearon los “PRIMERS” específicos para ello y se obtuvo un resultado positivo para las muestras estudiadas en las que se tenían dudas acerca de la degradación de su DNA obteniendo un amplificado de 256 pb, como se muestra en anexos, esto confirma que los resultados son válidos.

La PCR es un método que sigue evolucionando y que ha venido ganando terreno en el campo de la investigación, las respuestas obtenidas de numerosas investigaciones reflejan y respaldan su validez frente a otros métodos que si bien han venido dando buenos resultados en los últimos años y que pudieran ser menos costosos en cuanto a equipos y materiales utilizados, solamente detectan proteínas y la PCR en cambio detecta DNA.

CONCLUSIONES

El protocolo diseñado para la detección de Soya y Trigo por PCR funciona para localizar y detectar la presencia de estas dos especies en leches y quesos, según lo experimentado en la presente tesis de investigación. Su éxito depende de las condiciones en que se desarrolle el protocolo, desde la correcta extracción de DNA hasta la delicada preparación de las muestras.

En este estudio se encontraron 6 productos adulterados con soya, 2 para leche y 4 para quesos, de los cuales ninguno justifica su adición ni lo reporta en etiqueta como lo marca la NOM-051-SCFI-1994 de etiquetado. Para cada corrida experimental, antes se hicieron pruebas piloto a distintas condiciones y a partir de los resultados obtenidos en estas se fueron definiendo los parámetros necesarios para su ensayo final en donde se estableció desde la cantidad de DNA hasta la concentración del gel de agarosa y el marcador de peso molecular a utilizar. Por lo tanto los resultados obtenidos en su mayoría son definitivos ya que varios se confirmaron para descartar dudas y otros por falta de recursos y material no se pudieron someter a otras condiciones de experimentación para la confirmación de sus resultados.

Una de las incógnitas más destacadas de la presente tesis fue el daño sufrido en el DNA con el método de extracción empleado, ya que su absorbancia y concentración no eran las ideales para tener mejores resultados por que presentaban niveles de proteína ligeramente elevados y posibles residuos de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico que no se pudieron lavar totalmente con el etanol durante la purificación del DNA. Para este caso se procedió a correr una PCR utilizando “PRIMERS” de *Bos taurus* para que se definiera si las muestras amplificaban para vaca (que debiera ser nuestra especie natural ó única) y así de alguna manera se descartara el daño del DNA por el fenol cloroformo si es que las muestras no amplificaban ni siquiera para esta especie. Los resultados y sus condiciones se presentan en anexos y en ellos se confirmó la buena “calidad” del DNA de las muestras ya que todas amplificaron para *Bos taurus* sin excepción, mostrando así la eficacia del método tanto de extracción como de identificación de DNA.

En el caso de la ausencia de trigo en los productos estudiados según los resultados alojados por la PCR, no se repitió su prueba a condiciones distintas ya que las fotografías obtenidas fueron muy limpias comparadas con las de soya por lo que se suprimió cualquier otra evaluación que intentara descubrir la presencia de trigo en los productos evaluados.

En todas las PCR realizadas se preparó un “Blanco” que nunca amplificó, solamente las figuras 9 y 12 lo muestran para comprobar que las muestras no presentaran contaminación. En el resto de las fotografías no se reporta por el número insuficiente de pocillos del peine para la cámara de electroforesis y para que el resultado mostrara las muestras en una sola línea, en el caso de las leches líquidas cuyo número era mayor a las del resto las fotografías reportadas se editaron para que se presentaran igual a las del resto.

Es importante siempre para no desperdiciar material, hacer pruebas piloto que nos permitan como investigadores establecer las condiciones óptimas en las que se tendrían resultados más claros y así desechar cualquier duda de su claridad.

En cuanto al material y a la forma de trabajo es importante señalar que el área y los equipos y utensilios de trabajo deben de estar esterilizados, además de que el “Blanco” nunca debe de amplificar porque de lo contrario se asegura contaminación en las muestras o un diseño incorrecto de “PRIMERS” ó mal manejo de reactivos. Por lo tanto los resultados pudieran no ser certeros.

En estos protocolos de PCR, la extracción del DNA es en ocasiones el aspecto que causa un poco más de dificultad en cuanto de pureza se trata, sobre todo en lo que respecta a los alimentos en virtud a la presencia de aditivos que pudieran afectar la extracción o la composición muy diversa de ellos, es por ello que sería importante para confirmar todos nuestros resultados, utilizar nuevos protocolos de PCR directa, que no precisan de la extracción previa de DNA, sino que la muestra se toma directamente del alimento en cuestión, esto ha sido recientemente probado en el laboratorio para muestras de queso y leche líquida.

De esta manera se demuestra que PCR es un método que sigue evolucionando y que en su camino desecha los inconvenientes que se le presentan como es el caso de la pureza del DNA o de la difícil extracción de este. Afortunadamente la PCR directa pudiera evitar durante la investigación tanto tiempo como el uso de reactivos de costo elevado durante la investigación.

La conclusión evidente es que siguiendo una experimentación detallada, en todos los aspectos necesarios se obtendrán o no replicas de DNA al llevar a cabo una Reacción en Cadena de la Polimerasa, que permite a los usuarios de éste método, una forma transparente, precisa y eficiente en la valoración de sus resultados para la detección de especies ajenas en productos que no las debieran contener, y que además este método accede a la oportunidad para la construcción e implementación a nuevas aplicaciones, lo que constituye un estímulo para la propuesta de más protocolos que saquen ventaja de toda su excelencia y perfección en la búsqueda de incógnitas.

Siendo la PCR una técnica “muy potente” que permite detectar hasta una fracción muy pequeña de DNA para replicarla millones de veces, no deja de ser un método innovador y a su vez costoso pero que sin embargo su especificidad es de mucha utilidad en las investigaciones, no solo en la tecnología de alimentos, si no también en otras áreas muy ajenas a esta, como lo son la microbiología, la medicina para la detección de mutaciones genéticas, pruebas de paternidad, detección de agentes infecciosos, creación de mutaciones, y en la identificación de DNA en medicina forense, además de que es la técnica empleada para detectar el virus de la influenza porcina A-H1N1, solo por mencionar algunas aplicaciones. La propuesta de este trabajo permite identificar el origen de una adulteración por vía genética, por lo que se trata de un aporte metodológico que puede ser empleado en una gran cantidad de alimentos y productos en los que se quiera detectar este tipo adulteraciones proteicas que presenten riesgos importantes al consumidor y que además sean sustancias no reportadas en el etiquetado del producto, ya que no deben de estar presentes proteínas ajenas a las propias de la leche.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) MONDRAGÓN, G. *Mundo lácteo y cárnico*. 2005, 3, pp 18-19.
- (2) BERT, P.; KILNWICK, R.; POCKLINGTON. “The application of biotechnological methods in authenticity testing”. Eurofins Scientific. *Journal of Biotechnology* (2002) 107-112.
- (3) LÓPEZ, C.; GONZÁLEZ, I.; FAJARDO, V.; HERNÁNDEZ, P.; GARCÍA, T.; MARTÍN, R. “Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows’ milk in sheep’s and goats’ milk cheeses”. *International Dairy Journal*. 17 (2007) 87–93.
- (4) LOCKELY y BARDSLEY. “DNA Based Methods for food authentication”. *Trends in food science and Technology*. 11 (2000) 67-77.
- (5) SNYDER; KWON. “Soybean Utilisation”. Van Nostrand Reinhold, Amsterdam 1987
- (6) NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- (7) NMX-F-462-1984. Alimentos Lácteos-Queso Tipo Manchego.
- (8) SAGARPA. Subsecretaría de Desarrollo Rural
- (9) NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos frescos, madurados y procesados, especificaciones sanitarias.
- (10) DUCAUZE, Christian J. “Fraudes alimentarios, legislación y metodología analítica” Acrivia España 2006.
- (11) LÓPEZ, T.; GARCÍA R.; A. MANSO, M.; LÓPEZ F.; Rosina. “Detection of the presence of soya protein in Milk powder by sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis”. *Journal of Chromatography*. 1999. A, 836.
- (12) ROSAS MARTÍNEZ Mónica Roxana. Tesis de licenciatura *Estudio de la autenticación e identificación entre especies de pulpo y calamar en productos crudos y procesados al amplificar regiones específicas del DNA mitocondrial por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* Cuautitlán Izcalli México 2008.
- (13) MEYER, R., CANDRIAN, U. “PCR- based DNA análisis for the identification and characterization of food components”. *Lebensmittel-Wissenschaft and technology*. (1996) 1-9, 29.

- (14) PUERTAS, M. J. *Métodos del estudio del DNA. Genética: Fundamentos y perspectivas*. Ed. Interamericana. Mc Graw Hill. 1992.
- (15) SAMBROOK J.; FRITICH E.P.; MANISTIS T. *Molecular cloning*. Ed. Centennial. Tomo 2, USA 1989.
- (16) www.biotech.bioetica.org/images
- (17) LUQUE, H. *Biología celular e ingeniería genética*. Harcourt, Madrid España 2001.
- (18) <http://www.sciencemagazine.com>
- (19) SAMBROOK, J. y ROSSEL, D. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. EVA, Cold Spring. Garbor Laboratory Press. 2001.
- (20) universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm
- (21) CARRERA, E. "Salmon and trout analysis by PCR – RFLP for identify authentication". *Journal of food science*. (64) 3 (1999).
- (22) McPHERSON, M. J.; QUIERE P. and TAYLOR G.R. *PCR A Practical Approach*. England 1992.
- (23) J.H. Otto A. Towle.. *Biología moderna*. México Mc Graw-Hill. 1995.
- (24) RINZLER, C. A. "The New complement Book of Food. A Nutritional, medical and culinary guide". Facts On File, Inc. New York, 1999.
- (25) WHITE, A.P. *Principios de bioquímica*. Mc Graw Hill, México 1982.
- (26) KINGOMBE, CeÃ; ISIGIDI BIN, Sar; THI LUÉ, Elizabeth; SCHLOSSER, Heidi; HOWARD, Denise; KUHN, Monika; JEMMI, Thomas. "A PCR based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy" *Meat Science* (2001) 57.
- (27) CALVO, J. ZARAGOZA, H; and OSTA, R. "Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed an unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment" *Journal Animal Science* (2001) 79.
- (28) FREIFELDER, D.; *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverte, España 2003
- (29) CONCEPCIÓN, J.; PUERTA, B.; UREÑA, P.; *Prácticas de biología molecular*. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia 2005.
- (30) DALMASSO, A.; FONTANELLA, E Piatti, PCIVERA; ROSATIO, S., T., & BOTTERO, M. T "A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs". *Molecular and Cellular probes* (2004) 18.

- (31) AMILLS, M.; FRANCINO, O.; JANSA, & SÁNCHEZ, M. "Isolation of genomic DNA from milk samples by using chelex resin." *Journal of Dairy Research*. 64 (1997).
- (32) GONZÁLEZ, A.; FERNÁNDEZ, L. I.; CÉSPEDES, A.; RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ, M. A. "Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*) and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene". *Journal of the AOAC International*. 84. (2001).
- (33) <http://www.bioq.unizar.com.hsa/servicios/ap/biomol>
- (34) CARBONELL GUADARRAMA, Nancy. Tesis de licenciatura *Implementación de una técnica para la evaluación de la adulteración de jamón cocido con proteína de origen no cárnico*. Cuautitlán Izcalli México 1995.
- (35) ANGUITA G.; MARTIN R.; GARCIA, T.; MORALES, P.; HAZA, A. I.; GONZALEZ, L.; SANZ, B. & HERNANDEZ, P. E. "A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein". *Journal of Food Protection*, 60. (1997).
- (36) HURLEY, I. P.; COLEMAN, R. C.; IRELAND, H. E. & WILLIAMS, J. H. H. "Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration". *Journal of Dairy Science*. 87 (3) (2004).
- (37) MATSUNAGA, T.; CHIKUNI, K.; TANABE, R.; MUROYA, S.; SHIBATA, K.; YAMADA, J.; SHINMURA, Y. "A quick and sample method for the identification of meat species and meat products by PCR assay" *Meat Science*. 51 (1999).
- (38) MONTIEL SOSA, J. F.; RUIZ PESINI, E.; MONTOYA, J.; RONCALES, P.; LÓPEZ PÉREZ, M. J.; PEREZ- MARTOS, A. "Direct and Highly Species-Specific Detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA". *J Agric Food Chemistry*. 48 (2000)
- (39) DENDY A.V.; DOBRASZCZ BORG DAN David .*Cereales y productos derivados. Química y tecnología*. Ed Acribia, España 2001. Pp 155.
- (40) MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C, "Monophyletic origin of Lake Victoria Cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. (2000) 48.
- (41) MARC Maillet. *Manual de biología celular*. México 2003.

- (42) PEREIRA, F.; CARNEIRO J.; and AMORIN A. “Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges”. *Recent Patents on DNA & Gen Sequences*. (2008) 2.
- (43) www.sigenlab.com
- (44) JAN WILLEM, T. “The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication” *Biochemica et Biophysica Acta*. 1999
- (45) GONZÁLEZ SASTRE F.; GUINOVART J. J. *Patología molecular*. España 2003.
- (46) GHELLI, A.; CRIMI, M.; ORSINI, S.; GRADONI, L.; ZANNOTTI, M.; LENA Z G.; and DEGLI ESPOSTI M. “Cytochrome b of protozoan mitochondria: relationships between function and structure”. *Biochemical Physiology* 103B. 2, 1992.
- (47) XIAN JUN, S.; MASAO, K.; ATSUSHI, I.; TAKAO, N. “PCR-RFLP Analysis of Cytocrome b (cyt b) inheritance in the wild type strain and laboratory population of Japanese quail. Japan Department of animal science and technology, Faculty of Agriculture, Gifu University 1999. (No 64) 13-20.
- (48) POPPING, B. “The application of biotechnological methods in authenticity testing”. *Journal of biotechnology*. 98. (2002) 107-112.
- (49) WIDMER, F. Y BEFFA, R. *Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular*. Acribia España, 2000. pp247
- (50) <http://nanodrop.com/Library/CPMB-1st.pdf>
- (51) [http://www.promega.com/figures/popup.asp?partno=g8291&product=benchtop+100bp+dn
a+ladder&fn=0973tc](http://www.promega.com/figures/popup.asp?partno=g8291&product=benchtop+100bp+dna+ladder&fn=0973tc)
- (52) BENITEZ ESQUIVEL Gina. Tesis “Autenticación de especies de Salmon en productos comerciales amplificando regiones específicas del mtDNA, por medio de la Reacción en Cadena de la polimera (PCR)” .2004.
- (53) KANASAWA, A.; ASUMI, T.; SUMIE, K.; TETSUO, M.; JUN, A.; YOSHIYA, S. “Small interspersed sequences that serve as recombinant sites at the *cox2* and *atp6* loci in the mitochondrial genome of soybean are widely distributed in higher plants”. *Current Genomics*, 33 (1998).
- (54) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- (55) DZIUBA, J.; NALECZ, D.; MINKIEWICZ, P.; DZIUBA, B. “Identification and determination of milk and soybean protein preparations using enzymatic hydrolysis

followed by chromatography and chemometrical data analysis". *Analytica Chimica Acta*. 521 (2004) 17–24.

- (56) SHEFFLER IMMO, E. *Mitochondria*. USA 1999.
- (57) BOTTEROA, M. T.; CIVERAA, T.; NUCERA D., ROSATI, S.; SACCHI, P.; TURI, R.M.;. "A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products". *International Dairy Journal* 13 (2003) 277–282.
- (58) VILOJEN G. J.; NELAND L. H.; CROWTHER J. R. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Paisas Bajos 2005.
- (59) LOCKELY, A. K. y BARSDEY, R.G. DNA Based methods for food authentication. *Trends in Food science and Technology*. (2000) 11.
- (60) HEWEDY, M.M. and SMITH, C.J. "Detection of soy milk in pasteurized bovine milk". *Food Hydrocolloids*. Vol.3 no.5 (1989) pp.399-405.
- (61) RECIO, I.; AMIGO, L.; LÓPEZ FANDIFIO, R. "Assessment of the quality of dairy products by capillary". *Journal of Chromatography*. 697 (1997) 231-242.
- (62) BARTLETT, J. M.; STIRLING, D. *Methods in molecular biology PCR protocols*. U.S 2003.
- (63) www.biotech.bioetica.org/images
- (64) CARRERA, E. "PCR-RFLP of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase Gene: A simple Method for Discrimination Between Atlantic Salmon (Salmon Salar) and Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss)". *Journal of science of food and Agriculture* (1999) 79.
- (65) MEYER, R. y CANDRIAN, U. "PCR-based DNA Análisis for the identification and Characterization of Food Components". *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 29, 1-9, 1996.
- (66) HEWEDY, M. M. and SMITH, C.J.. "Detection of soy milk in pasteurized bovine milk". *Food Hydrocolloids*. Vol.3 no.5 (1989) pp.399-405.
- (67) DÍAZ R.; MARTÍNEZ B. *Redacción técnica*. Instituto Politécnico Nacional. Dirección de publicaciones Tres Guerras. México 2001.
- (68) NMX-F-026-1997. Leche. Denominación. Especificaciones comerciales y métodos de prueba.
- (69) NORMA Oficial Mexicana NOM-051-SCFI-1994, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.

ANEXOS

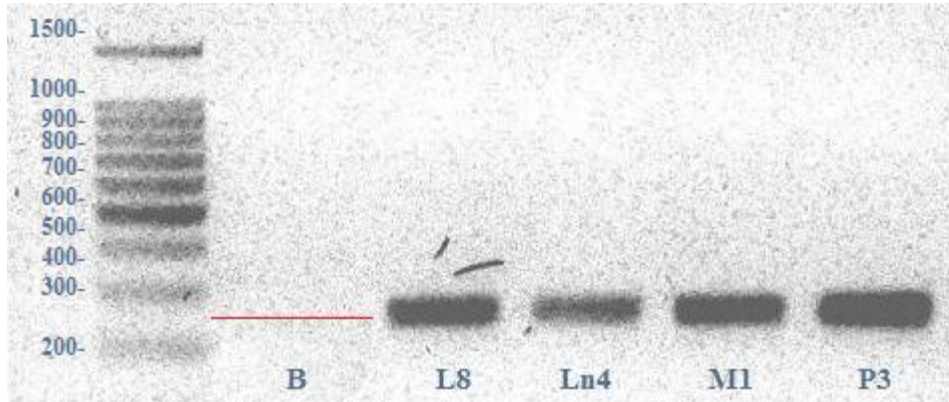


Fig 15.- Resultados para comprobar la calidad de DNA de las muestras L8, Ln4, M1 y P3.
A ésta PCR se le adicionaron “PRIMERS” de *Bos taurus* (65).

Sense 916 (5' GTACTACTAGCAACAGCTTA 3')

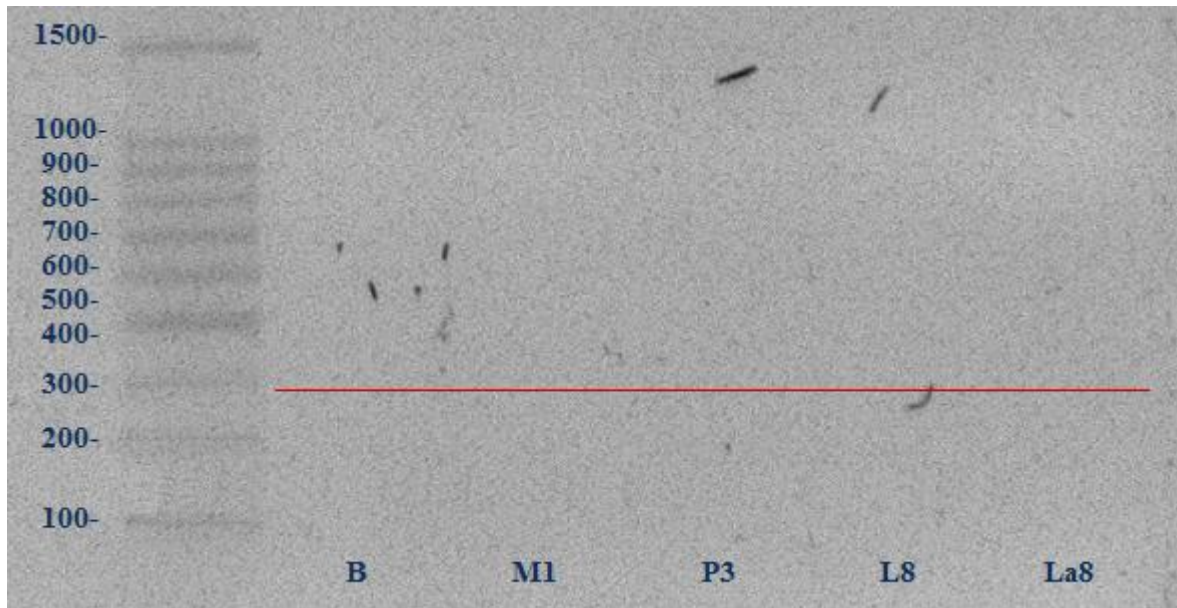
256 bp

Antisense 1171 (5' GCTTGATTCTCTTGGTGTAGAG 3')

GenBank accession number.

Gel de Agarosa al 2%

Marcador de peso molecular de 100bp



Fotografía para verificar resultados en los que se tenían ligeras sospechas en su amplificación para soya. Los “PRIMERS” y las condiciones fueron las mismas a las experimentales reportadas.

“PRIMERS” propuestos para la elaboración de un protocolo que permita identificar la presencia de Chicharo (*Pisum sativum*) en productos lácteos.

Dichos “PRIMERS” se elaboraron en un programa bioinformático (BLAST) en internet en donde se ingresaron los parámetros de temperatura propuestos, la secuencia genética para esta especie se sacó del banco genético del mismo programa, que fue de donde también se sacó la información para la elaboración de los “PRIMERS” de trigo que para este caso se diseñaron manualmente según lo reportado en el tema 3.1.2.1.

The image shows the Primer-BLAST web interface. The title bar reads "Primer-BLAST" and "A tool for finding specific primers". Below the title bar, there is a navigation bar with "BI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).", "more...", and "Tips for". Below the navigation bar, there are three links: "Reset page", "Save search parameters", and "Retrieve recent results".

The main interface is divided into two main sections: "PCR Template" and "Primer Parameters".

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

```
catgagcaga ttgtatccat tgggcaaata taggttcgat caagatttgt ttctctggag
tgccaaaagc aagcatgaca tcattatgga cataaagtcc caaagtatgg aaccccagaa
ataggctggc ccaacttaaa tgggatatga tagcttcttt gtgctctaac attcttgcca
atacattatc cgcgttctgt tcgggattgt aatctcgaat gaaaaagata ggtccatgag
```

Forward primer
Reverse primer

Or, upload FASTA file [Examinar...](#)

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size

Min	Max
<input type="text"/>	<input type="text"/>

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min	Opt	Max	Max T_m difference
<input type="text" value="57.0"/>	<input type="text" value="65.0"/>	<input type="text" value="72.0"/>	<input type="text" value="2"/>

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CGCCCTGGGCCGTCGCAAGG	Plus	20	732	751	65.07	80.00%
Reverse primer	TGGTCCGGCTTTGAATGCGGGTCCG	Minus	24	977	954	63.75	62.50%
Product length	246						

Primer pair 2

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	ACCACCTCGCCCTGGGCCGT	Plus	20	725	744	64.74	75.00%
Reverse primer	TGGTCCGGCTTTGAATGCGGGTCCG	Minus	25	977	953	64.55	60.00%
Product length	253						

Primer pair 3

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CACCTCGCCCTGGGCCGTCG	Plus	20	727	746	64.20	80.00%
Reverse primer	GGTCCGGCTTTGAATGCGGGTCCG	Minus	23	976	954	62.67	65.22%
Product length	250						

Primer pair 4

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	TCGCCCTGGGCCGTCGCAAG	Plus	20	731	750	64.15	75.00%
Reverse primer	GGTCCGGCTTTGAATGCGGGTCCG	Minus	24	976	953	63.53	62.50%
Product length	246						

Primer pair 5

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CGCCAAAGGTGTGCGTTCATGAGCC	Plus	25	359	383	63.13	60.00%
Reverse primer	CCTTCCGACGGCCAGGGCCG	Minus	20	751	732	65.07	80.00%
Product length	393						

Primer pair 6

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CTGCCCTGGGCCGTCGCAA	Plus	20	730	749	64.15	75.00%
Reverse primer	ATGGTCCGGCTTTGAATGCGGGTCCG	Minus	25	978	954	63.68	60.00%
Product length	249						

Primer pair 7

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	AGGTGTGCGTTCATGAGCCCATGCT	Plus	25	365	389	62.89	56.00%
Reverse primer	ACGGCCAGGGCGAGGTGGT	Minus	20	744	725	64.74	75.00%
Product length	380						

Primer pair 8

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CCACCTCGCCCTGGGCCGTC	Plus	20	726	745	63.92	80.00%
Reverse primer	GGTCCGGCTTTGAATGCGGGTCGAA	Minus	25	976	952	63.62	60.00%
Product length	251						

Primer pair 9

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GCCAAAGGTGTGCGTTCATGAGCCC	Plus	25	360	384	62.89	60.00%
Reverse primer	CGACGGCCAGGGCGAGGTG	Minus	20	746	727	64.20	80.00%
Product length	387						

Primer pair 10

	Sequence (5'→3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	TACCACCTCGCCCTGGGCCG	Plus	20	724	743	62.71	75.00%
Reverse primer	TGGTCCGGCTTTGAATGCGGGT	Minus	22	977	956	61.27	59.09%
Product length	254						
