



Análisis y tipificación de carne de Búfalo mediante la amplificación por qPCR. Comunicación.

Guidi, S.^{1,2,3*}; Ambrosi, V.^{1,2,3,4}; Diaz, G.^{1,2,4}; Cadoppi, A.⁵; Nanni, M.⁶; Cunzolo, S.^{1,2,3,7}

1. Instituto Tecnología de Alimentos, (ITA), CIA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham, Argentina. 2. Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables (UEDD INTA CONICET), Castelar, Argentina. 3. Escuela Superior de Ingeniería, Informática y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón, Bs As, Argentina. 4. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Bs As, Argentina. 5. Fуска S.A. La Filiberta, Entre Ríos, Argentina. 6. Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham, Argentina.

INTRODUCCIÓN

La carne es una de las principales fuentes de alimentación por su aporte de proteína. En los últimos años, los consumidores, tanto a nivel nacional como internacional, han presentado interés en fuentes alternativas a la de carne vacuna (ej. avestruz, buey de Kobe, búfalo, etc.). En este sentido, la producción de carne de búfalo (*Bubalus bubalis*), se encuentra en desarrollo en Argentina, y proporciona una alternativa a la producción de carne en regiones que no son adecuadas para el ganado vacuno. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aptitud de la metodología de PCR en tiempo real (qPCR), para diferenciar ambas especies (vacuna y bubalina) utilizando los *primers* diseñados para la especie *Bos taurus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó muestra de carne bovina (vaca y búfalo)

- ADN
- ✓ Extracción (por triplicado): a partir de 25 mg, utilizando resina Chelex (BioRad)
- ✓ Cuantificación: por fluorimetría utilizando con Qubit™ 2.0 (dsDNA BR Kit; Thermofisher Scientific).
- ✓ Diluciones seriadas desde 1 a 10⁻⁷, ADN vacuno
- qPCR
- ✓ PCR Master mix: 5 µL de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), y 0,3 µL de los *primers* específicos para COI *Bos Taurus* (300nM conc. final) y 2 µL de ADN. Volumen final: 10µl
- ✓ Condiciones de la amplificación: 3' – 98 °C, 40 ciclos – 98 °C - 5'' y 30'' – 60 °C seguido por una curva de *melting* de los productos amplificados (60 a 90 °C; 0,3 °C 2-5 seg/ciclo)
- ✓ El límite de cuantificación (LOQ) fue calculado de acuerdo a la mínima dilución de ADN en la que todas las réplicas pueden detectarse cuantitativamente con precisión

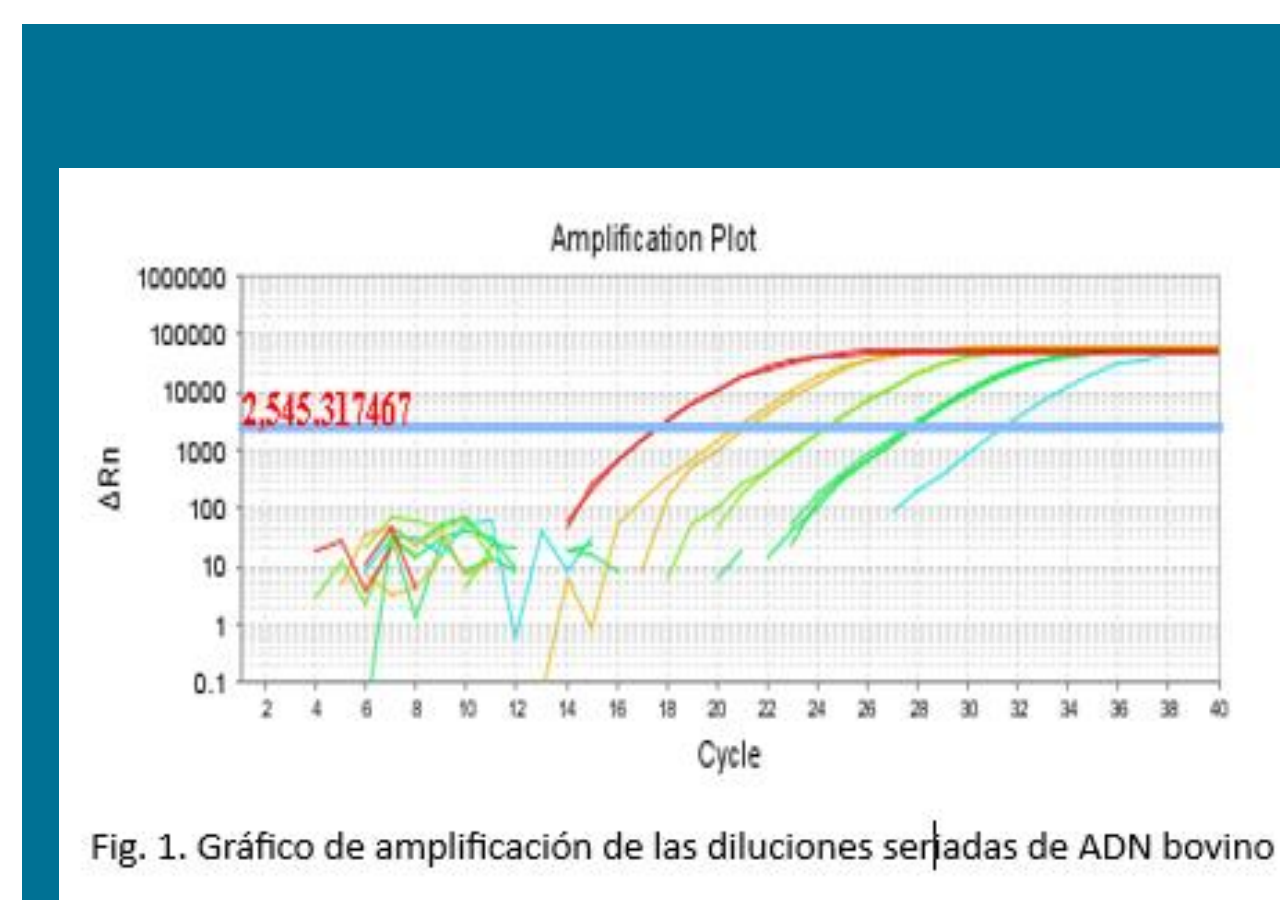


Fig. 1. Gráfico de amplificación de las diluciones seriadas de ADN bovino

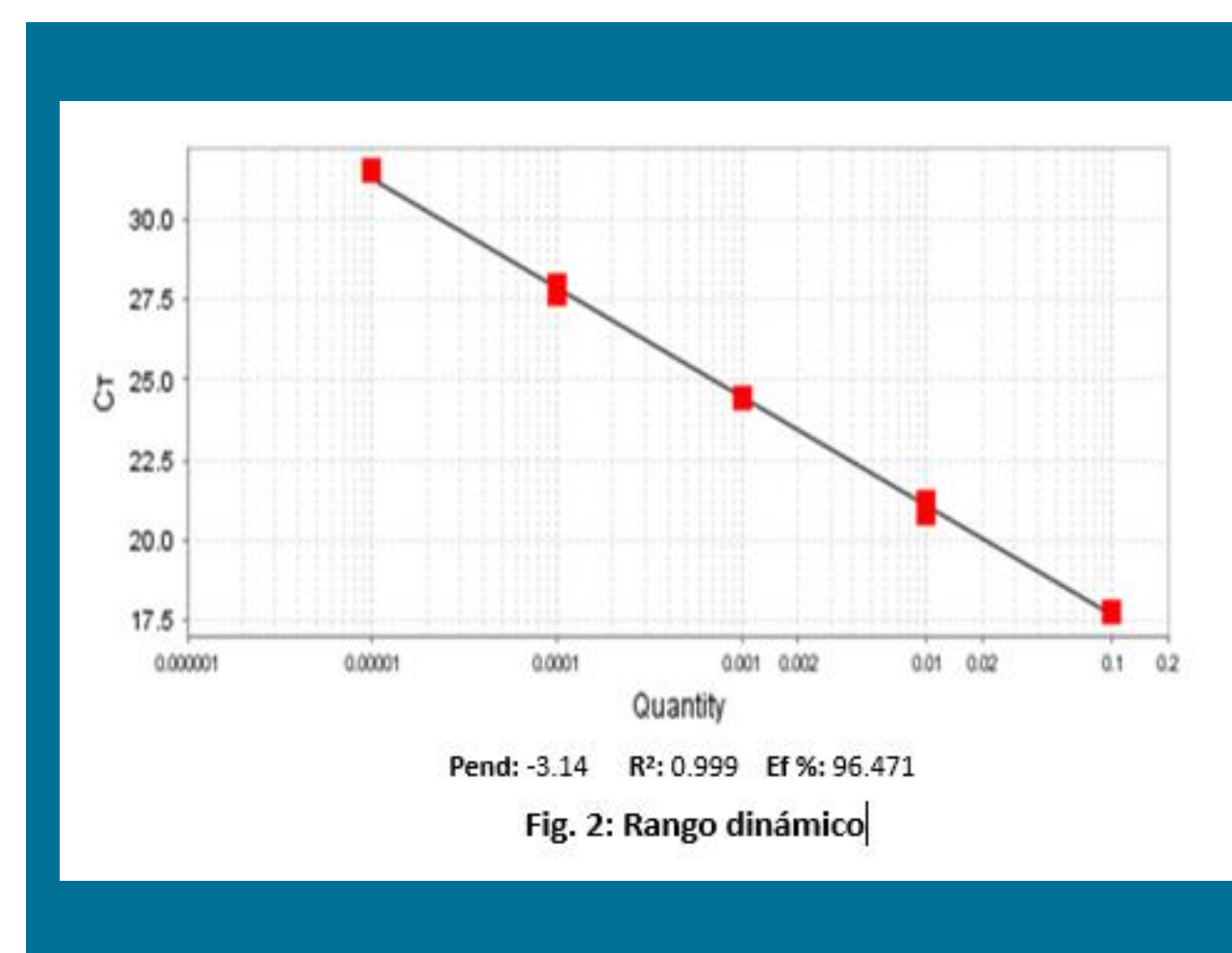


Fig. 2: Rango dinámico

RESULTADOS

En la se observa el gráfico de amplificación de las diluciones seriadas (1 a 1x10⁻⁶) de la muestra de ADN vacuno, y en la Fig. 2 el rango dinámico para los *primers* específicos de COI de *Bos Taurus*. En la Fig. 3 se observa la curva de *melting* (desnaturalización) de las diferentes muestras analizadas. La curva violeta (izquierda), corresponde a ADN obtenido de tejido de vacuno, mientras que la curva en celeste (derecha) corresponde a ADN extraído de muestra pura de búfalo. La temperatura a la cual se alcanza la disociación del producto de PCR se define como temperatura de *melting* (Tm). Dicha temperatura es específica del producto PCR, y depende de su longitud y del contenido de bases CG. Para la muestra de ADN vacuno, la Tm fue de 78.6 °C y Ct = 21.5, mientras que para búfalo fue Tm= 79.9 °C y un Ct = 27.25, de este modo se pudo diferenciar ambas carnes mediante la amplificación.

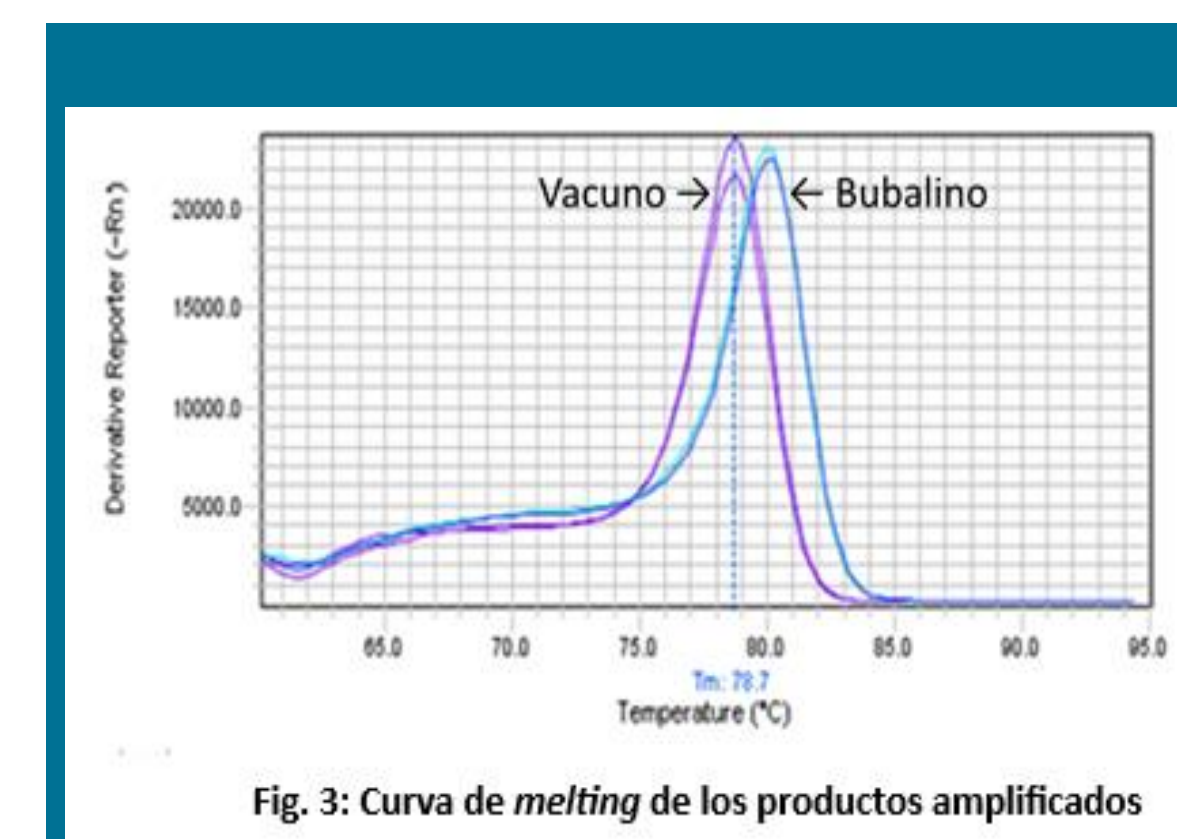


Fig. 3: Curva de *melting* de los productos amplificados

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron determinar que los *primers* diseñados para *Bos taurus*, fueron capaces de amplificar diferencialmente muestras de ADN puras de vacuno y bubalino. Si bien existe similitud de secuencias que presentan ambas especies de la subfamilia bovina, se logró, a partir de las Tm de ambas muestras puras diferenciar ambos tipos de carne, de manera analítica.