

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК
ГМ кукурузы линии MON-810
методом полимеразной цепной реакции

MON-810

Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК ГМ кукурузы линии MON-810 в продуктах питания и продукции растениеводства методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов MON-810 основан на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В наборе MON-810 в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации ДНК ГМ кукурузы линии MON-810 и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы).

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2. Состав набора

Набор состоит из следующих комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала включает:

- смесь №1 – 5 пробирок (по 23 мг);
- раствор №2 – 1 флакон (12,5 мл);
- раствор №3 – 1 флакон (12,5 мл);
- раствор №4 – 1 флакон (5 мл);
- раствор №5 – 25 флакон (25 мл);
- раствор №6 – 1 флакон (38 мл);
- раствор №7 – 1 флакон (50 мл);
- раствор №8 – 1 флакон (50 мл).

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР–амплификации можно узнать у представителя компании.

2. Комплект реагентов для ПЦР–амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 50 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq–полимеразы – 1 пробирка (500 мкл);
- буферный раствор «ПЦР–буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

2.3. Время проведения анализа – 4 ч.

2.4. Набор рассчитан на проведение 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах, содержащих ДНК ГМ кукурузы линии MON–810, после проведения реакции амплификации ПЦР–детектор должен регистрировать положительный результат.

В образцах, не содержащих ДНК ГМ кукурузы линии MON-810, ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат

3.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора: не более 200 геном-эквивалентов ДНК ГМ кукурузы линии MON810 на реакционный объём.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09.

4.2. Мерами предосторожности при работе с набором реагентов является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4. Работать с набором следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.5. При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.7. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

4.8. Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.9. Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и

пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

- 4.10.** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.11.** Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.1285–03. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.
- 4.12.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- 4.13.** Дезактивацию отработанных реагентов, обработку одежды, обеззараживание исследуемого материала проводят в соответствии МУ 1.3.2569–09 и СП 1.3.1285–03.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов MON–810 требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор;
- ПЦР–детектор;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 50 °С;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники вместимостью 1–20 мкл; 1–

200 мкл; 100–1000 мкл;

- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1–20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Отбор, хранение и подготовка проб пищевых продуктов проводят в соответствии с Методическими указаниями МУ 4.2.1913–04.

6.1. Отбор проб проводят по государственным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904, 9163, 12292, 10852, 12430, 13979, 26313, 22617.0, 27668, 26312.1, 9792, 7631.

6.2. Отбор образцов

От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:

- от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5 – 10 г) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20х30 см с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50 – 100 г);
- из общей пробы отбирают среднюю пробу в 10 – 20 г, помещают в полиэтиленовый пакет с застёжкой–молнией размером не более 10х15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20х30 см, печатают и отправляют на анализ.

От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу весом 10 – 50 г в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с застёжкой–молнией размером не более 10х15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожжённые в пламени газовой горелки) инструменты, печатают и отправляют на анализ.

Пробы жидких продуктов отбирают в чистые ёмкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объёмом не более 50 см³, печатают и отправляют на анализ.

При отборе проб составляется акт отбора проб, который

вместе с отобранной пробой отправляется в лабораторию.

6.3. Подготовка проб к анализу

Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и пестики, предварительно обработанные хромовой смесью и фламбированные инструменты – пинцеты, скальпели, ножницы.

Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 3 – 5 г и растирают пестиком до гомогенного состояния.

Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 3 – 5 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до гомогенного состояния.

Пробы продуктов консистенции крахмала весом 100 – 300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 см³ физиологического раствора. Для анализа необходимо 50 – 150 мм³ образца.

Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими пипетками с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50 – 150 мкл образца.

Из полученных гомогенатов и суспензий проводят выделение ДНК.

6.4. Условия хранения и транспортирования

Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре минус 20°C) в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа).

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный

образец. Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, промаркированную «К-», внести 50 мкл физиологического раствора стерильного. Далее проводить пробоподготовку в пробирке «К-», не содержащей анализируемого материала, в соответствии с инструкцией.

7.1.1. Приготовить буфер для выделения (на 10 образцов): добавьте в пробирку со смесью №1 2,5 мл раствора №2, встряхнуть на вортексе до полного растворения содержимого пробирки. Добавьте 2,5 мл раствора №3 и 1 мл раствора №4. Перемешать на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Готовый буфер для выделения не подлежит хранению, его необходимо использовать в течение часа после приготовления!

7.1.2. В пластиковую пробирку ёмкостью 1,5 мл, содержащую 20 – 30 мг анализируемого материала, добавить 500 мкл буфера для выделения. Тщательно гомогенизировать образец и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.3. Термостатировать пробирку в течение 5 мин при 65 °С.

7.1.4. Добавить 500 мкл раствора №5 и тщательно встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.5. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.

7.1.6. Аккуратно перенести верхнюю фазу в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

7.1.7. Добавить 750 мкл раствора №6 и перемешать, 2–3 раза аккуратно перевернув пробирку.

7.1.8. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.

7.1.9. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.10. Добавить 1мл раствора №7 и несколько раз перевернуть пробирку.

7.1.11. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.

7.1.12. Удалить надосадочную жидкость.

7.1.13. Подсушить осадок термостатированием пробирки с открытой крышкой в течение 5 мин при 65 °С.

7.1.14. Добавить 100 мкл раствора №8.

7.1.15. Термостатировать пробирку 15 мин при 65 °С, периодически встряхивая пробирку.

Полученный препарат ДНК хранить при минус 20°С в течение 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Для использования в ПЦР препарат ДНК необходимо развести в 10 раз раствором №8.

Примечание. В растворе №3 допускается выпадение осадка. Перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона в течение 10–15 мин при 65 °С.

7.2. Проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-», для положительного контрольного образца – «К+». Также необходимо промаркировать дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.

7.2.2. Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.2.3. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

7.2.4. Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.2.5. В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.6. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3–5 с.

7.2.7. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом для амплификаторов с активным регулированием, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 1. Формат «FLASH»

Режим амплификации для амплификатора Терцик
(ООО «НПО ДНК–Технология»)
Алгоритм регулирования – «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °С	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 64,0 67,0	0 0 0	20 5 5	5
3	94,0 64,0 67,0	0 0 0	1 5 5	40
4	10,0	хранение

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8 °С в течение 24 часов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР–ДЕТЕКТОРА

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР–детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75–2,10, для внутреннего контрольного образца – 2,50).

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР–ДЕТЕКТОРА

9.1. Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР–детектором.

9.2. В образцах, содержащих ДНК ГМ кукурузы линии MON–810, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

- 9.3.** В образцах, не содержащих ДНК ГМ кукурузы линии MON-810, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.
- 9.4.** В случае отрицательного результата на наличие ДНК ГМ кукурузы линии MON-810 и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие биологического материала.
- 9.5.** Программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфики (наличие ДНК ГМ кукурузы линии MON-810) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.4).
- 9.6.** При получении положительного результата на наличие ДНК ГМ кукурузы линии MON-810 для отрицательного контрольного образца «К-», результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.
- 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**
- 10.1.** Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала и ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности.
- 10.3.** Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.4.** Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

- 10.5.** Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.6.** Предприятие–изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора MON–810, следует обращаться в ООО «НПО ДНК–Технология» по адресу:
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11
Тел./факс + 7 (495) 980-45-55
E-mail: mail@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru

ООО «НПО ДНК–Технология»
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11
Тел./факс (495) 980-45-55
E-mail: mail@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru