

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК
промотора CaMV 35S и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens*
методом полимеразной цепной реакции

ФЛАНК-ГЕН

Внимание! Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ФЛАНК-ГЕН предназначен для выявления ДНК промотора CaMV 35S (далее по тексту – промотор 35S) и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens* (далее по тексту – терминатор NOS) в пробах продукции растениеводства и продуктов питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов ФЛАНК-ГЕН 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 ФЛАНК-ГЕН 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 раздельно регистрировать результаты амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, 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:

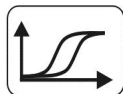
- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 50 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq–полимеразы – 1 пробирка (500 мкл);
- буферный раствор «ПЦР–буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР–буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК–зонды, внутренний контрольный образец. Буферный раствор «ПЦР–буфер» – включён только в комплекты формата «FLASH».

В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР–амплификации выпускается в двух форматах:



«FLASH» – предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора.



«Real-time» – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов.

2.3. Время проведения анализа – 4 ч.

2.4. Набор рассчитан на проведение 48 определений в формате «Real-time», 50 определений в формате «FLASH» включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS, после проведения реакции амплификации детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК промотора 35S и не содержащих ДНК терминатора NOS, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. 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.).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

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

- 4.5.** Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
- 4.6.** Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.
- 4.7.** 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.
- 4.8.** 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.
- 4.9.** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.10.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

При работе с набором реагентов ФЛАНК-ГЕН требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для наборов в формате «FLASH») или детектирующий амплификатор (для наборов в формате «Real-time»);
- ПЦР-детектор;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;

- 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.

При работе с набором в формате «FLASH» для детекции результатов требуется:

- ПЦР–детектор.

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 20x30 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 10x15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный

полиэтиленовый пакет размером 20x30 см, печатаывают 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 10x15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, печатаывают и отправляют на анализ.

Пробы жидких продуктов отбирают в чистые ёмкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 см³, печатаывают 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 °С) 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 объёмом 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 объёмом 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 учетом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-», для положительного контрольного образца – «К+». При использовании ПЦР–детектора для учёта результатов амплификации (формат «FLASH») 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.

- 7.2.6. 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.
- 7.2.7. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3–5 с.
- 7.2.8. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

После окончания амплификации пробирки перенести в помещение для проведения детекции результатов ПЦР.

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

Таблица 2. Формат «Real-time»

Режим амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °C	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15			
4	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 3. Формат «Real-time»

Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.
Программа амплификации

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, C°	PCR/Melt Data Acquisition
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	01:30	94,0	
2	5				
		1	00:30	94,0	
		2	00:45	64,0	
3	2				
		1	00:30	80,0	Real Time
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:45	64,0	Real Time
5		10,0	storage

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. 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).

8.2. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ–322 и ДТ–96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ–322, ДТ–96).

8.3. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР–ДЕТЕКТОРА ИЛИ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА

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

9.2. В биологических образцах, содержащих ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

9.3. В биологических образцах, не содержащих ДНК промотора 35S и не содержащих ДНК терминатора NOS, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

9.4. В случае отрицательного результата на наличие ДНК промотора 35S, терминатора NOS 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.** При учёте результатов с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфики (наличие ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS) 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 промотора 35S и/или терминатора NOS 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 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала и ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности.
- 10.2.** Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.3.** Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 10.4.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.5.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора ФЛАНК-ГЕН, 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