



ИНСТРУКЦИЯ

по применению наборов реагентов для выявления промотора 35S CaMV или терминатора NOS агробактерии в пробах продукции растениеводства и продуктов питания, содержащих ДНК соответствующих растений, методом полимеразной цепной реакции

ПРОМОТОР-ГМ СОЯ
ПРОМОТОР-ГМ КУКУРУЗА
ТЕРМИНАТОР-ГМ СОЯ
ТЕРМИНАТОР-ГМ КУКУРУЗА
ТЕРМИНАТОР-ГМ КАРТОФЕЛЬ

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

Инструкция

по применению наборов реагентов для выявления промотора 35S CaMV или терминатора NOS агробактерии в пробах продукции растениеводства и продуктов питания, содержащих ДНК соответствующих растений, методом полимеразной цепной реакции

**ПРОМОТОР-ГМ СОЯ
ПРОМОТОР-ГМ КУКУРУЗА
ТЕРМИНАТОР-ГМ СОЯ
ТЕРМИНАТОР-ГМ КУКУРУЗА
ТЕРМИНАТОР-ГМ КАРТОФЕЛЬ**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Наборы реагентов предназначены для выявления промотора 35S CaMV (ПРОМОТОР-ГМ СОЯ, ПРОМОТОР-ГМ КУКУРУЗА) или терминатора NOS агробактерии (ТЕРМИНАТОР-ГМ СОЯ, ТЕРМИНАТОР-ГМ КУКУРУЗА, ТЕРМИНАТОР-ГМ КАРТОФЕЛЬ) в пробах продукции растениеводства и продуктов питания, содержащих ДНК соответствующего растения (сои, кукурузы или картофеля) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Наборы реагентов основаны на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Применение наборов позволяет одновременно определять наличие в образце «маркера трансгенности» и ДНК растения, что позволяет контролировать ход ПЦР в каждой пробирке и существенно уменьшает вероятность появления ложных результатов.

Для анализа продуктов ПЦР применяют детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси,

состоящей из двух слоёв, разделённых 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.

В смесь для амплификации из состава наборов в форматах «Real-time» и «FLASH» 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 ДНК регуляторных элементов и ДНК растений, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты их амплификации.

2.2. Состав наборов

Каждый 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 – 1 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 – 48 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 (75 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды (в форматах «Real-time» и «FLASH»).

Буферный раствор «ПЦР-буфер» включён только в комплекты формата «FLASH».

Дополнительно, по запросу потребителей возможна поставка **комплекта реагентов для детекции ДНК**, который включает:

- смесь для электрофореза – 16,9 г (1 пакет);
- агарозный гель – 5 пластин

В зависимости от способа детекции результатов ПЦР-амплификации ДНК комплекты реагентов ПРОМОТОР-ГМ СОЯ и ПРОМОТОР-ГМ КУКУРУЗА выпускаются в форматах «FLASH», «Real-time» и «Форез». Комплекты реагентов ТЕРМИНАТОР-ГМ СОЯ, ТЕРМИНАТОР-ГМ КУКУРУЗА и ТЕРМИНАТОР-ГМ КАРТОФЕЛЬ выпускаются в формате «Real-time».



Формат «FLASH» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора (флуоресцентная детекция по конечной точке).



Формат «Real-time» предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов (в режиме реального времени).



Формат «Форез» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

2.3. Время проведения анализа - 4 ч.

2.4. Набор рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

3.1.1. При детекции продуктов амплификации с помощью детектирующего амплификатора (формат «Real-time»)

Для образцов, содержащих ДНК промотора 35S (терминатора NOS) и ДНК соответствующего растения, прибор должен фиксировать превышение порогового значения флуоресценции в каналах FAM и HEX. Для образцов, не содержащих ДНК промотора 35S (терминатора NOS), при этом содержащих ДНК соответствующего растения, прибор должен фиксировать превышение порогового значения только в канале HEX.

Для образцов, не содержащих ни ДНК промотора 35S (терминатора NOS), ни ДНК соответствующего растения, прибор не должен фиксировать превышение порогового значения в обоих каналах.

Пороговые значения для каждого из каналов зависят от типа амплификатора и даже конкретного образца прибора, но в общем случае могут быть определены как минимальные значения, достоверно превышающие уровень фоновой флуоресценции.

3.1.2. При детекции продуктов амплификации с помощью флуоресцентного детектора «Джин» (формат «FLASH»)

Для образцов, содержащих ДНК промотора 35S (терминатора NOS) ПЦР-детектор должен фиксировать положительный результат. Для образцов, не содержащих ДНК промотора 35S (терминатора NOS), при этом содержащих ДНК соответствующего растения, ПЦР-детектор должен фиксировать отрицательный результат. Для образцов, не содержащих ни ДНК промотора 35S (терминатора NOS), ни ДНК соответствующего растения, ПЦР-детектор должен фиксировать недостоверный результат.

3.1.3. При детекции продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза (формат «Форез»)

Для образцов, содержащих ДНК промотора 35S (терминатора NOS) и ДНК растения, должны быть видны две полосы оранжево-красного цвета, соответствующей длины (см. таблицу 5).

Для образцов, не содержащих ДНК промотора 35S (терминатора NOS), при этом содержащих ДНК растения, должна быть видна одна полоса оранжево-красного цвета,

соответствующая эндогенному внутреннему контролю (см. таблицу 5).

Для образцов, не содержащих ни ДНК промотора 35S (терминатора NOS), ни ДНК соответствующего растения, специфические полосы должны отсутствовать.

3.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность составляет не более 100 копий ДНК промотора 35S (терминатора NOS) на амплификационную пробирку и не более 100 копий ДНК растений на амплификационную пробирку.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1.** Мерами предосторожности при работе с наборами 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, проведения ПЦР и проведения электрофореза 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.
- 4.11.** При работе с включённым трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.
- 4.12.** Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с наборами реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для наборов в форматах «FLASH» и «Форез») или детектирующий амплификатор (для наборов в формате «Real-time»;
- 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.

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

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1 мм.

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 10x15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожжённые в пламени газовой горелки) инструменты, опечатывают и отправляют на анализ.

Пробы жидких продуктов отбирают в чистые ёмкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объёмом не более 50 см³, опечатывают 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 однородного состояния.

Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 3 – 5 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до однородного 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 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): добавить в пробирку со смесью №1 2,5 мл раствора №2, встряхнуть на вортексе до полного растворения содержимого пробирки. Добавить 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 надсадочную жидкость.

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

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

- 7.1.12. Удалите надосадочную жидкость.
- 7.1.13. Подсушить осадок термостатированием пробирки с открытой крышкой в течение 5 мин при 65°C.
- 7.1.14. Добавить 100 мкл раствора №8.
- 7.1.15. Термостатировать пробирку 15 мин при 65°C, периодически встряхивая пробирку.

Полученный препарат ДНК хранить при минус 20°C 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°C.

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–» и для положительного контрольного образца – «К+». При использовании для учёта результатов амплификации ПЦР-детектора (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, маркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).
- 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+» и «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 сек.
- 7.2.7. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблицах, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

Таблица 1. Формат «Real-time»

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

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, C°	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	00:30	80,0	
2	1				
		1	01:00	94,0	
3	10				
		1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
4	2				
		1	00:20	62,0	Real Time
Программа амплификации					
5	40				
		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
		3	00:20	67,0	
6		10,0	storage

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	2	00	1		Цикл
2	94,0	1	30	1		Цикл
3	94,0	0	10	50	√	Цикл
	62,0	0	20			
	67,0	0	20			
4	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 3. 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 4. Формат «Форез»

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	93,0	1	30	1
2	93,0 64,0 72,0	0 0 0	20 5 1	5
3	93,0 64,0 72,0	0 0 0	1 1 1	40
4	10,0	хранение

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») и iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится приборами автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкциями к приборам (см. «Руководство пользователя» для ДТ-322, ДТ-96, iCycler iQ).

8.2. 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).

8.3. Регистрация результатов амплификации с использованием электрофореза

8.3.1. Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие с помощью стальной проволоки диаметром примерно 2 мм. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в ёмкости с водопроводной водой.

8.3.2. Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу вместимостью 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре в течение 1 недели или при температуре от 2 до 8°C в течение 1 месяца.

8.3.3. Заполнить камеру для электрофореза раствором буфера для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Раствор буфера для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 1 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.3.4. Внести по 7 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буфер.

ВНИМАНИЕ! В каждом ряду лунок обязательно должны быть представлены положительный и отрицательный контрольные образцы.

8.3.5. Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.3.6. После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.3.7. Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.3.8. Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты.

9. УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Таблица 5

Длина продуктов ПЦР-амплификации и
назначение флуоресцентных меток

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов*	Флуоресцентная метка («FLASH», «Real-time»)
ПРОМОТОР-ГМ СОЯ		
Промотор 35S CaMV	199	FAM
Эндогенный внутренний контроль – ДНК сои (<i>Glycine max</i>)	343	HEX
ПРОМОТОР-ГМ КУКУРУЗА		
Промотор 35S CaMV	199	FAM
Эндогенный внутренний контроль – ДНК кукурузы (<i>Zea mays</i>)	398	HEX
ТЕРМИНАТОР-ГМ СОЯ		
Терминатор NOS		FAM
Эндогенный внутренний контроль – ДНК сои (<i>Glycine max</i>)		HEX
ТЕРМИНАТОР-ГМ КУКУРУЗА		
Терминатор NOS		FAM
Эндогенный внутренний контроль – ДНК кукурузы (<i>Zea mays</i>)		HEX
ТЕРМИНАТОР-ГМ КАРТОФЕЛЬ		
Терминатор NOS		FAM
Эндогенный внутренний контроль – ДНК картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>)		HEX

* – для комплектов в формате «Форез»

Интерпретация результатов исследования

Формат «FLASH». Результат, выданный «ДЖИН»	Формат «Real-time». Превышение порогового значения флуоресценции		Формат «Форез»	Интерпретация
	Канал FAM (трансген)	Канал HEX (эндогенный внутренний контроль)		
+	+	+	две полосы	Обнаружен промотор 35S (терминатор NOS), обнаружена ДНК соответствующего растения*
-	-	+	одна полоса, соответствующая эндогенному внутреннему контролю	Не обнаружен промотор 35S (терминатор NOS), обнаружена ДНК соответствующего растения*
нд	-	-	отсутствие полос	Недостовверный результат (ПЦР необходимо переставить), или некорректное исследование (образец не содержит ДНК соответствующего растения)

* – системой «ТЕРМИНАТОР-ГМ КАРТОФЕЛЬ» в некоторых случаях может выявляться также ДНК томата (*Solanum lycopersicum*)

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРОВ

10.1. Срок годности наборов: формат «FLASH» – 6 месяцев, форматы «Форез» и «Real-time» – 9 месяцев с даты изготовления.

10.2. Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала и ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.

10.3. Транспортирование наборов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих

условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

- 10.4.** Наборы с истекшим сроком годности применению не подлежат.
- 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 наборов для выявления промотора 35S CaMV или терминатора NOS агробактерии, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6

Тел./факс +7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

ДНК-Технология
Москва, Варшавское ш., д. 125ж, к. 6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru