

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК кукурузы  
(*Zea mays*) методом полимеразной цепной реакции

## СКАН-КУКУРУЗА

**ВНИМАНИЕ!** Изучите инструкцию перед началом работы



## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор реагентов СКАН-КУКУРУЗА предназначен для выявления ДНК кукурузы (*Zea mays*) в пробах продукции растениеводства и продуктов питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

## **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

### **2.1. Принцип действия**

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

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 слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

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 искомой ДНК и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы).

## 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 – 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 – 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 («K+») – 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» – включен 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 50 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

### **3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**3.1.** Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих ДНК кукурузы (*Zea mays*), после проведения реакции амплификации детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК кукурузы (*Zea mays*) детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат.

**3.2.** Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора: не более 100 геном-эквивалентов ДНК кукурузы на реакционный объём.

### **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 СКАН-КУКУРУЗА требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для наборов в формате «FLASH») 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 объемом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 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 объемом 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 МУК 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 20 x 30 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 застежкой-

молнией размером не более 10 x 15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20 x 30 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 10 x 15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожженные 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 см<sup>3</sup>, 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 см<sup>3</sup> физиологического раствора. Для анализа необходимо 50–150 мм<sup>3</sup> образца.

Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими пипетками с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50– 50 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-», внесите 50 мкл физиологического раствора стерильного. Далее проведите пробоподготовку в пробирке «К-», не содержащей анализируемого материала, в соответствии с инструкцией.

#### **7.1.1. Приготовьте буфер для выделения (на 10 образцов):**

- добавьте в пробирку со смесью №1 2,5 мл раствора №2;
- встряхните на вортексе до полного растворения содержимого пробирки;
- добавьте 2,5 мл раствора №3 и 1,0 мл раствора №4;
- перемешайте 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, добавьте 500 мкл буфера для выделения. Тщательно гомогенизируйте образец и встряхните пробирку на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.3. Термостатируйте пробирку в течение 5 мин при 65°C.

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

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

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

- 7.1.7. Добавьте 750 мкл раствора №6 и перемешайте, 2–3 раза аккуратно перевернув пробирку.
- 7.1.8. Центрифугируйте пробирку 10 мин при 13000 об/мин.
- 7.1.9. Удалите надосадочную жидкость.
- 7.1.10. Добавьте 1,0 мл раствора №7 и несколько раз переверните пробирку.
- 7.1.11. Центрифугируйте пробирку 5 мин при 13000 об/мин.
- 7.1.12. Удалите надосадочную жидкость.
- 7.1.13. Подсушите осадок термостатированием пробирки с открытой крышкой в течение 5 мин при 65°C.
- 7.1.14. Добавьте 100 мкл раствора №8.
- 7.1.15. Термостатируйте 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. Промаркируйте необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К–», для положительного контрольного образца – «К+». При использовании ПЦР-детектора для учёта результатов амплификации (формат «FLASH») промаркируйте дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.
- 7.2.2. Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 7.2.3. В каждую пробирку добавьте по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закройте пробирки.

7.2.4. Внесите 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», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.

Все пробирки центрифугируйте при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3–5 сек.

7.2.6. Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1–3, 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

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)

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	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
Программа амплификации					
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.

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8°C в течение 1 суток.

## **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 и 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 И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ**

### **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 искомые участки генома кукурузы (*Zea mays*), программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

**9.3.** В биологических образцах, не содержащих искомые участки генома кукурузы (*Zea mays*), в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

- 9.4.** В случае отрицательного результата на наличие искомых участков генома кукурузы 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 искомых участков генома кукурузы) попадает в зону неопределённости результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учёт не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.4).
- 9.6.** При получении положительного результата на наличие искомого участка генома кукурузы 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: формат «FLASH» – 6 месяцев, формат «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 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 надежных 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 реагентов СКАН-КУКУРУЗА, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.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  
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6  
Тел./факс +7 (495) 980-45-55  
E-mail: [help@dna-technology.ru](mailto:help@dna-technology.ru)  
[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)