

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ Тест-системы «АртТест ГМО Кукуруза»

Назначение Тест-системы

Тест-система «АртТест ГМО Кукуруза» предназначена для выявления ДНК генетически модифицированной кукурузы в продуктах питания и кормах для животных методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Тест-система позволяет выявлять фрагменты ДНК: промотор последовательности 35S вируса мозаики цветной капусты (P-35S), фрагмент терминатора гена нопалин-синтетазы *Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS). Также в анализе определяется эндогенный контроль (ЭК) – ген *hmgA*, присутствующий в трансгенных и немодифицированных сортах кукурузы.

Характеристика Тест-системы

Комплектация тест-системы «АртТест ГМО Кукуруза» рассчитана на проведение 55 анализов, включая контроли.

Таблица 1. Состав наборов «АртТест ГМО Кукуруза»*

Состав	Комплектация
1. ПЦР-реагент	1 пробирка – 0,71 мл
2. Праймеры Кукуруза	1 пробирка – 0,42 мл
3. ПКО	1 пробирка – 0,2 мл
4. ОКО	1 пробирки – 1,0 мл

* - по согласованию с заказчиком комплектация и объемы реагентов могут быть изменены.

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование набора для выделения ДНК «АртДНК».

Соответствие каналов детекции ДНК мешеням.

Канал для флуорофора	Cy5/Red	JOE/Yellow	ROX/Orange
ДНК-мишень	<i>hmgA</i>	P-35S	T-NOS

Лимит детекции (LOD): составляет не менее 0,01% генетически модифицированного ингредиента при анализе 100 нг ДНК кукурузы.

Аналитическая чувствительность: 10³ копий ДНК в 1 мл выделенного образца последовательностей ДНК мишеней P-35S, T-NOS, ЭК.

Аналитическая специфичность: Отсутствие сигнала по каналам ДНК-мишеней P-35S, T-NOS при тестировании нетрансгенных образцов кукурузы.

Оборудование и материалы

Амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»; ПЦР-бокс; центрифуга/вортекс; набор дозаторов переменного объема; одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема; одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5–2,0 мл; оптические пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора; штативы для пробирок и наконечников; холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С; отдельный халат и одноразовые перчатки; емкость для сброса наконечников; комплект средств для обработки рабочего места.

Проведение анализа

Выделение ДНК. Проводится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя набора для выделения ДНК.

Подготовка ПЦР-смеси.

Общий объем реакции – **25 мкл**, объем пробы ДНК – **5 мкл**.

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

1. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) должны входить 3 контрольные пробы: отрицательный контроль экстракции (ОКЭ) – 1 пробирка, отрицательный контроль ПЦР (К-) – 1 пробирка, положительный контроль ПЦР (К+) – 1 пробирка.

В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер Микс».

-12,5*(N+3,5) мкл ПЦР-реагента + 7,5*(N+3,5) мкл праймеров

N – количество исследуемых образцов без учета контрольных реакций.

Допускается округление значений в большую сторону.

Для удобства расчетов – воспользуйтесь таблицей.

Внимание! Данные в таблице приводятся с учетом всех необходимых контролей для анализа N-образцов.

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ПЦР-реагент	56	69	81	94	106	119	131	144	156	169	181	194
Праймеры	34	41	49	56	64	71	79	86	94	101	109	116

N	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	23
ПЦР-реагент	206	219	231	244	256	269	281	294	306	319	331	344
Праймеры	124	131	139	146	154	161	169	176	184	191	199	206

N	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
ПЦР-реагент	356	369	381	394	406	419	431	444	456	469	481	494
Праймеры	214	221	229	236	244	251	259	266	274	281	289	296

N	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
ПЦР-реагент	506	519	531	544	556	569	581	594	606	619	631	644
Праймеры	304	311	319	326	334	341	349	356	364	371	379	386

Перемешать смесь путем 5-х кратного переворачивания пробирки, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в микропробирки, в которых будет проходить амплификация.

Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов.

Поставить контрольные реакции амплификации:

- 1) ОКЭ – внести в пробирку 5 мкл ОКЭ;
- 2) К- – внести в пробирку 5 мкл ОКО;
- 3) К+ – внести в пробирку 5 мкл ПКО.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием.

Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в блок амплификатора*. Запрограммировать прибор согласно инструкции фирмы производителя.

* Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	2 мин	1
Денатурация	95	10 сек	10
Отжиг/Элонгация	63	30 сек	
Денатурация	95	10 сек	30
Отжиг/Элонгация/Детекция по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	63	30 сек	

Анализ результатов

1. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene»:

– активировать функции «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*»;

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0–30 %*;

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости данный параметр может быть изменен в диапазоне 0,02–0,2*.

б) для приборов «Bio-Rad CFX96»:

– активировать функции «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*»;

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25–250*.

* Необходимость корректировки выбросов и пороговой линии возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.

Примечание: в зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.

2. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов).

3. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице.

1. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контроли	Контролируемый этап анализа	Значение «Сt» по каналу		
		Cy5/Red	JOE/Yellow	ROX/Orange
ОКЭ	Экстракция ДНК	–	–	–
К-	ПЦР	–	–	–
К+	ПЦР	+	+	+

*- Появление значений Сt в данных точках свидетельствует о контаминации процесса выделения ДНК/постановки ПЦР. Требуется перестановка всех проб.

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям – анализ необходимо переделать, начиная со стадии экстракции ДНК.

4. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с полученными данными.

Соответствие выявляемых последовательностей ДНК и используемых каналов детекции

Последовательность ДНК	Значение «Сt»		
	Cy5/Red	JOE/Yellow	ROX/Orange
ЭК кукурузы	≤ 25	–	–
P-35S	–	+	–
T-NOS	–	–	+

Интерпретация результатов

В образце обнаружена ДНК кукурузы (ЭК), если в таблице результатов по каналу Cy5/Red для него определено значение порогового цикла $Ct \leq 25$. При получении значения Ct в таблице результатов для анализируемой пробы более 25 требуется перестановка начиная с экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

В образце обнаружен промотор P-35S, если в таблице результатов по каналу JOE/Yellow для него определено значение порогового цикла Ct .

В образце обнаружен терминатор T-NOS, если в таблице результатов по каналу ROX/Orange для него определено значение порогового цикла Ct .

При отсутствии значения Ct по всем каналам необходимо повторно провести исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считать не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

Проблема	Возможная причина проблемы	Варианты решения проблемы
Нет сигнала по каналу «Cy5/Red»	Малое количество ДНК кукурузы	используйте новый образец материала
Нет сигнала в K+	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	аккуратно приготовьте новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установите параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	используйте наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала по любому из каналов в K- и/или ОКЭ	Контаминация	-проведите деконтаминационные процедуры; - используйте новые наборы

Транспортировка и хранение Тест-системы

Транспортировка тест-системы осуществляется при температуре +2 – +8 °С не более 30 суток или при температуре менее 30 °С в течение суток.

Компоненты тест-системы хранят в упаковке изготовителя при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается хранение всех компонентов тест-системы при температуре +2 – +8 °С в течение 90 дней.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы не более 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ГМО Кукуруза» – 12 месяцев с даты изготовления.