

BIOTOOLS

BIOTOOLS B & M LABS. S. A.

Fabricado por:

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
e-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

BIOFOOD Kits

Kits para detección e identificación de especies de vertebrados en alimentos usando secuencias génicas

STANDARD KIT

Ref. 91.112

Manual de Uso

ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO.

INFORMACIÓN GENERAL

Los kits **BIOFOOD** permiten la detección y, según el kit considerado, la identificación de especies animales en muestras alimentarias frescas o procesadas. El sistema de detección está basado en la amplificación de ácidos nucleicos por PCR. El kit ha sido ensayado tanto en muestras frescas como procesadas (incluidos piensos). El ADN es extraído y purificado a partir de las muestras alimentarias, utilizado como molde en la reacción de amplificación y el producto de PCR analizado por electroforesis en geles de agarosa.

BIOFOOD STANDARD detecta la presencia de ADN de vertebrados (mamífero, ave, reptil, anfibio o pez¹) en una muestra mediante la amplificación de un gen mitocondrial muy conservado a lo largo de la evolución (*citocromo b*). Este gen ha sido seleccionado tanto por presentar un número de copias elevado en el genoma de los vertebrados, como por su elevada homología entre especies. El **BIOFOOD STANDARD** kit también detecta la presencia de material de origen vegetal mediante la amplificación del gen *rbcl* de cloroplasto; gen con un número de copias elevado en el genoma de las plantas y una secuencia ampliamente conservada.

USO EXCLUSIVO INVESTIGACIÓN

Algunas de las aplicaciones que pueden ser llevadas a cabo por este producto pueden estar cubiertas por patentes aplicables en determinados países. La compra de este producto no incluye o proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas. Los usuarios podrían tener que obtener una licencia según el país y/o la aplicación. BIOTOOLS no apoya el uso sin licencia de aplicaciones patentadas.

POR FAVOR, COMPRUEBE LA INTEGRIDAD DEL KIT Y SUS COMPONENTES ANTES DE USARLO. EL USO DE KITS DETERIORADOS PUEDE CONLLEVAR LA FALTA DE RESULTADOS Y/O RESULTADOS INCORRECTOS.

PRINCIPIO

El ADN molde se obtiene tanto de muestras frescas como procesadas utilizando un método de extracción optimizado para muestras alimentarias². Antes del ensayo es conveniente confirmar la calidad del ADN extraído (concentración 50-100 ng / µl, $A_{260/280}=1.8 - 2.0$, y ausencia de inhibidores de PCR). Se recomienda comprobar la calidad e idoneidad del ADN purificado procesando en paralelo el/los controles positivos suministrados con el kit.

El kit **BIOFOOD STANDARD** se basa en la amplificación de regiones del gen *citocromo b* de vertebrados y del gen *rbcl* de plantas, mediante una PCR multiplex en la que cada reacción genera un amplicón de tamaño diferente. La PCR multiplex permite la detección simultánea de material vegetal y/o animal.

El kit **BIOFOOD STANDARD** puede ser utilizado con muestras heterogéneas (más de un componente). El kit posee una sensibilidad ≥ 0.5 %.

REACTIVOS

El kit incluye suficientes reactivos para llevar a cabo 48 reacciones de amplificación (Ref. 91.112). A fin de minimizar los riesgos de contaminación y reducir el número de ciclos de congelación/descongelación, el kit se suministra en dos sets de 24 reacciones. Descongele y manipule los reactivos en hielo. Para uso frecuente se recomienda realizar alícuotas de los reactivos a fin de reducir los ciclos de congelación/descongelación.

- **Master Mix** Dos viales: 2 x 405 µl
La Master Mix incluye todos los reactivos para llevar a cabo las reacciones de amplificación, excepto el $MgCl_2$ y la ADN polimerasa.
Almacenar a -15 ± 8 °C.
- **$MgCl_2$ Solution (50mM)** Dos viales: 2 x 1.8 ml
Almacenar a -15 ± 8 °C. Descongelar en hielo. Mezclar bien antes de su uso.
- **DNA Polymerase (1U/µl)** Dos viales: 2 x 50 µl
Almacenar a -15 ± 8 °C. Añadir a las mezclas de reacción justo antes de introducir las en el termociclador.
- **Amplification Control (Control Positivo)** Dos viales: 2 x 40 µl
Fragmentos de ADN específicos, de origen animal y vegetal, preparados por PCR.
Almacenar a -15 ± 8 °C.

¹ La detección es de vertebrado en general, sin determinar qué gran grupo de vertebrado está presente.

² Las muestras alimentarias suelen tener multitud de componentes (aditivos, colorantes, conservantes) que pueden inhibir la reacción de amplificación. Utilizar un método de purificación del ADN elimine estos inhibidores, manteniendo la integridad del ADN de la muestra.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Área de pre-amplificación

- Instrumentos, reactivos y material fungible requeridos por el método de purificación de ADN que vaya a ser utilizado (ver instrucciones del fabricante)
- Cronómetro
- Pipetas³ (capacidad 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa⁴
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Agua calidad bidestilada estéril
- Tubos de polipropileno con cierre de rosca, capacidad para 1,5 ml, no siliconizados, cónicos, estériles, libres de RNasa. Se recomienda el uso de tubos con cierre de rosca, para evitar la contaminación potencial de muestras y controles
- Gradillas para tubos de 1,5 ml
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor⁵ o sustancia equivalente para eliminar ADN de superficies de trabajo

Área de amplificación

- Termociclador en tiempo final.
- Cabina de flujo laminar
- Gradillas para tubos de 0,2 ml
- Tubos de reacción (0,2 ml, pared fina)
- Agua calidad bidestilada estéril
- Pipetas (capacidad 2, 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor (Ref. 40.201) o equivalente

Área de post-amplificación

- Cubetas y fuentes de electroforesis
- Sistema de fotografía o fotodocumentación
- Transiluminador con luz UV
- Bromuro de etidio
- Agarosa de baja EEO (Ref. 20.011) o equivalente
- TAE o TBE
- Marcador de ADN de 150 a 700 bp mínimo (Ref. 31.006) o equivalente
- Buffer de carga de electroforesis
- Pipetas (capacidad 10 y 20 µl) con puntas con o sin filtro
- Guantes de examen desechables
- Mascarilla / gafas protectoras UV
- Microondas

³ La precisión de las pipetas debe estar dentro del 3 % del volumen indicado. Si es necesario, calibrar y revisar de forma regular, según las instrucciones del fabricante. Se recomienda el uso de puntas con filtro sin RNasa para aerosol y desplazamiento positivo, con el fin de evitar contaminaciones cruzadas de muestras y amplicones.

⁴ Se recomienda el uso de juegos de pipetas diferentes para cada paso de la reacción (pre-amplificación, amplificación), con el fin de evitar contaminaciones que podrían dar lugar a falsos positivos.

⁵ Disponible en el catálogo de BIOTOOLS (Ref. 40.201).

PROTOCOLO

NOTA: Descongele todos los reactivos en hielo. Mantener en hielo mientras dure su manipulación. La amplificación debe iniciarse dentro de los 10 minutos posteriores de añadir las muestras y controles a la mezcla de amplificación. Compruebe el funcionamiento del termociclador de forma regular. La no calibración o calibración deficiente del instrumento puede conllevar la aparición de resultados inexactos.

1.- El volumen final de la reacción es de **50 µL**. Determine el volumen adecuado de **Master Mix, MgCl₂, DNA Polymerase** y **Control Positivo** necesarios para el análisis de las muestras y los controles. Se recomienda incluir un Control Positivo y un Control Negativo (sin ADN) en cada ronda de análisis.

2.- Preparar la mezcla de reacción siguiendo las instrucciones de la Tabla 1. Llevar a cabo este proceso en la campana de flujo laminar y mantener la mezcla de reacción en hielo durante su manipulación.

Tabla 1

Reactivo	µL/ rxn
Master Mix	15 µL
MgCl ₂ Solution	2 µL
DNA Polymerase	1,25 µL
Agua bidestilada	26,75 µL

3.- Alicuotear **45 µL** de la mezcla preparada en cada tubo de reacción.

4.- Retirar los tubos de la campana de flujo laminar y añadir:

- ✓ **Control Positivo: 5 µL** del control positivo proporcionado con el kit.
- ✓ **Muestras: 100 ng** de ADN purificado y completar con agua bidestilada estéril hasta 50 µL.
- ✓ **Control Negativo (sin ADN): 5 µL** del agua bidestilada estéril.

5.- Cerrar los tubos de reacción, mezclar y centrifugar ligeramente. Colocar los viales en el termociclador.

6.- Llevar a cabo la reacción de amplificación utilizando el siguiente programa:

94 °C	90 seg	
94 °C	10 seg	} 40 ciclos
55 °C	90 seg	
72 °C	40 seg	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los productos de amplificación se observan mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de baja EEO (por ejemplo, MB Agarosa, Ref. 20.011). Para la visualización de las bandas de amplificación se recomienda utilizar geles de agarosa al 1.5-2 % y buffer TAE 1X o TBE 0.5X como buffer de electroforesis. Se recomienda añadir el bromuro de etidio al gel para una mejor visualización y resolución.

NOTA: El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. Recomendamos el uso de guantes y las máximas precauciones a la hora de manejarlo.

El resultado para muestras positivas es el indicado:

MATERIAL	AMPLICON
Vertebrado	359 bp
Vegetal	190 bp
Vertebrado + vegetal	359 bp + 190 bp

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

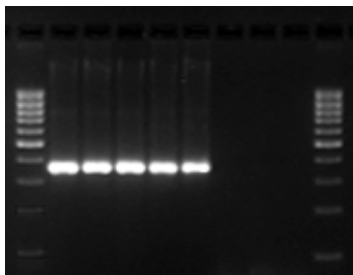


Figura 1. Amplicones específicos de vertebrado (359 bp) en muestras de: pescado, anfibio, reptil, pájaro y mamífero (carriles 1 a 5, respectivamente).
Controles negativos (ADN de origen vegetal: soja (carril 6) y maíz (carril 7).
Control negativo (sin molde): carril 8
M: 100 bp DNA Ladder (Ref. 31.006).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M

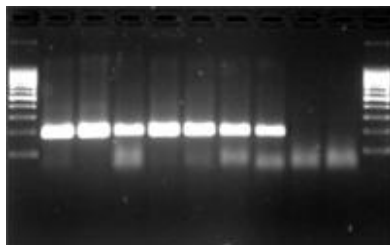


Figura 2. Amplicón específico de planta (190 bp) en muestras de: soja, harina de soja, maíz, patata, tabaco, lechuga y cebolla (carriles 1-7, respectivamente).
Control negativo (ADN de origen animal): carril 8.
Control negativo (sin molde): carril 9
M: Marcador 100 bp DNA Ladder (Ref. 31.006).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M

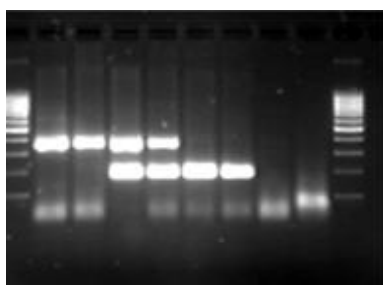


Figura 3. Amplicones de vertebrados (359 bp) y vegetales (190 bp).
ADN de muestras de origen animal: carriles 1 y 2.
ADN de muestras de origen vegetal: carriles 5 y 6.
ADN de muestras mixtas: carriles 3 y 4.
Control negativo (sin molde): carriles 7 y 8.
M: 100 bp DNA Ladder (Ref. 31.006).

CONTROL DE CALIDAD

El Control Positivo debe generar dos bandas de 359 bp y 190 bp. En los viales de control negativo (agua bidestilada estéril) no deben visualizarse bandas. Cualquier análisis que no cumpla estos criterios debe ser totalmente invalidado y descartado. Es necesario repetir el proceso desde el inicio, incluyendo la fase de purificación del ADN, y procesar otra alícuota de la muestra original.

PRECAUCIONES

1. Las tareas de laboratorio han de llevarse a cabo de modo unidireccional, desde la zona de pre-amplificación a la zona de amplificación. Las actividades de pre-amplificación deben iniciarse con la preparación del reactivo y proceder a la preparación de la muestra. Los materiales y equipos deben estar dedicados a cada actividad de pre-amplificación y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. En cada área deben usarse guantes que deben cambiarse antes de dejar el área. El equipo y los materiales usados para la preparación de reactivos no deben usarse para actividades de preparación de la muestra ni para pipetear o procesar ADN amplificado u otras fuentes de ADN objetivo.
2. Como es el caso con cualquier procedimiento analítico, es indispensable utilizar una buena técnica de laboratorio para obtener un rendimiento apropiado de esta prueba. Debido a la gran sensibilidad analítica de esta prueba, se debe proceder con extrema cautela a fin de conservar la pureza de todos los reactivos del kit o de las mezclas de amplificación. Todos los reactivos deben ser vigilados estrechamente para verificar su pureza. Deseche todos los reactivos sospechosos.
3. Deben seguirse las instrucciones fielmente con el fin de obtener resultados correctos. En caso de duda, consulte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).
4. Esta prueba ha sido validada únicamente para usar con los reactivos incluidos en el kit. El uso de otros métodos de amplificación, o el uso de aparatos e instrumentos que no cumplan las especificaciones indicadas puede dar resultados incorrectos. El usuario es responsable de validar las modificaciones que se hagan a la prueba propuesta, en cualquiera de los parámetros indicados.
5. Utilice guantes de examen desechables libres de polvo mientras maneje reactivos o muestras, así como bata de laboratorio. Lave sus manos concienzudamente después de haber llevado a cabo el test.
6. Abrir y cerrar los tubos de los reactivos con cuidado. Respetar las condiciones de temperatura y exposición a la luz indicadas en el apartado correspondiente. Tras el uso, cerrar bien los materiales contenidos en el kit, cuando proceda, y almacenarlos a las temperaturas indicadas.
7. No utilizar el producto más allá de la fecha preferente de uso
8. Los componentes del kit han sido testados como una unidad. **No intercambie componentes** de otros kits, o componentes de diferentes lotes
9. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a degradación por nucleasas. Las nucleasas están presentes en la piel humana o superficies que han estado en contacto con humanos. Lave con Termi-DNA-Tor y cubra las superficies de trabajo con papel adecuado. Utilice guantes de examen libres de polvo y desechables a lo largo de todo el proceso
10. Debe extremarse el cuidado a la hora de alícuotar los diferentes volúmenes en cada paso de la reacción. Mezcle bien tras la adición de cada reactivo, salvo que se indique expresamente lo contrario. Lea las instrucciones de uso de las pipetas para un uso adecuado
11. No pipetear con la boca
12. El material de acondicionamiento del kit es resistente en las condiciones de almacenamiento indicadas. El almacenamiento en condiciones diferentes a las indicadas puede conllevar la rotura del material de acondicionamiento, y la posible contaminación del kit.
13. El material de plástico incluido en el kit es resistente en las condiciones normales de uso. El uso del material plástico en condiciones extremas puede conllevar su rotura, y por tanto, la inutilización del kit.
14. Pueden obtenerse resultados negativos falsos debido a inhibición de la polimerasa. Se recomienda llevar a cabo controles que discriminen entre inhibición y un resultado negativo.
15. La contaminación cruzada entre muestras y con ADN exógeno sólo puede ser evitada mediante las buenas prácticas de laboratorio. Deben seguirse las indicaciones de este folleto de forma fiel.
16. El uso de este producto está limitado únicamente a personal profesional cualificado en el manejo de técnicas de purificación de ADN y amplificación de ADN.
17. Es importante pipetear las cantidades exactas indicadas en las instrucciones de uso, y mezclar bien tras cada adición de reactivo cuando así lo indiquen las instrucciones. Compruebe de forma regular el funcionamiento de sus pipetas.

GARANTÍA

Los productos están garantizados para estar conformes con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su periodo de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS, portes pagados, o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.

Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Producto para uso exclusivo en investigación. Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España.



BIOTOOLS® es marca registrada de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.