

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

BIOGENICS Kits

*Kits para la detección de GMOs
en alimentos frescos y procesados*

Bt-176 Maximizer MAIZE IDENTIFICATION KIT Cat. No. 91.232

Instrucciones de Uso

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

Bt-176 Maximizer MAIZE IDENTIFICATION KIT

Uso exclusivo en investigación

Algunas de las aplicaciones que pueden ser llevadas a cabo por este producto pudieran estar protegidas en algún país por una patente. 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

COMPRUEBE LA INTEGRIDAD DEL KIT Y SUS COMPONENTES ANTES DE USARLO. EL USO DE KITS DETERIORADOS PUEDE INDUCIR A RESULTADOS INCORRECTOS

1. INFORMACIÓN GENERAL

Los kits BIOGENICS permiten la detección de GMOs (Organismos Modificados Genéticamente, transgénicos) en alimentos frescos y procesados para alimentación humana y/o animal. El sistema de detección está basado en la estabilidad de los ácidos nucleicos, capaces de resistir los procesos habitualmente utilizados en la industria alimentaria (temperatura, vacío, secado, etc.). El kit ha sido testado tanto en muestras frescas como altamente procesadas (semillas, hojas, frutos, raíces, harina, galletas, comida enlatada, material liofilizado o texturizado, etc). El DNA de las muestras es purificado y posteriormente es amplificado utilizando primers específicos para la detección de GMOs. Los productos de amplificación son visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa.

Los kits BIOGENICS se basan en los métodos de el Environment Institute, Consumer Protection & Food Unit (EUR 18684 EN, Annex II), utilizando primers optimizados con el fin de detectar el máximo número posible de GMOs. La sensibilidad mínima es del 0.1 % (aunque este valor puede ser menor en algunas muestras, dependiendo de su composición y grado de procesamiento). Este límite está por debajo del umbral fijado por la UE (Reglamentos 1829/2003 y 1830/2003).

2. PRINCIPIO

Biotoools recomienda el uso de un kit de extracción y purificación de ADN que permita obtener un DNA con las siguientes características: concentración 50-100 ng / µl, $A_{260/280}=1.8 - 2.0$, ausencia de inhibidores que puedan afectar al resultado de la reacción de amplificación¹, etc. Se recomienda comprobar la calidad e idoneidad del ADN purificado para reacciones de amplificación, por ejemplo, realizando amplificaciones control en paralelo.

El kit BIOGENICS Bt-176™ MAIZE se basa en la detección y amplificación de regiones específicas del GMO maíz Bt-176™ (gen *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*) no presentes en maíz nativo, así como secuencias genéricas de GMOs (promotor 35S²), presente en aproximadamente el 90% de los GMOs comercializados hasta la fecha. Asimismo el kit detecta la presencia de maíz genérico (gen invertasa presente tanto en maíz nativo como en maíz GMO) e incluye amplificaciones control, con el fin de discriminar un falso negativo debido a inhibición de la amplificación de resultados negativos reales.

El kit BIOGENICS Bt-176™ MAIZE puede ser utilizado con muestras heterogéneas con más de un componente, detecta la presencia de maíz Bt-176™, así como de GMOs que contengan el promotor 35S. Sin embargo, no detecta los GMOs que contienen únicamente el terminador NOS.

3. REACTIVOS

El kit contiene los reactivos en formato líquido en la cantidad necesaria para poder realizar 48 reacciones de amplificación (Cat. No. 91.232). Para minimizar los riesgos de contaminación de los viales, así como facilitar el uso del Kit en varios ensayos, el Kit se presenta en dos sets de 24 reacciones. Descongele y manipule los reactivos en hielo.

- Master Mixes

Solución Tris-HCl que contiene: <10 % glicerol, KCl, <0,001 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP y primers. Las Master Mixes incluye todos los reactivos para la amplificación del gen correspondiente (excepto MgCl₂ y DNA polimerasa) en las proporciones adecuadas.

- **35S Master Mix:** Dos viales: 2 x 405 µl para la identificación del promotor 35S (indica presencia de GMO).

¹ Las muestras alimentarias, debido a su composición (aditivos, colorantes, conservantes) tienen multitud de componentes que puedan dar lugar a inhibición de la reacción de amplificación. Es por ello fundamental que el método de purificación del DNA elimine estos inhibidores, manteniendo la integridad del DNA de la muestra.

² Secuencias del virus del mosaico de la coliflor (promotor 35S) pueden estar presentes en plantas nativas de la familia *Cruciferae* infectadas por este virus. El análisis de este tipo de muestras debería incluir un segundo control para asegurar que la presencia del promotor 35S se debe a manipulación genética.

- **Maize Master Mix:** Dos viales: 2 x 405 µl
para la identificación de maíz (reacción control, indica presencia de maíz – gen invertasa, presente en maíz nativo y en maíz GMO).
- **BT Gene Master Mix:** Dos viales: 2 x 405 µl
para la identificación de maíz Bt-176™ (indica presencia de maíz Bt-176™– gen *cry1Ab*)

Almacenar a –15±8 °C. Descongelar y manipular en hielo. No congelar/descongelar repetidamente. Para uso frecuente, recomendamos distribuir el contenido del vial en alícuotas.

- **MgCl₂ 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** Dos viales: 2 x 140 µl

Almacenar a –15±8 °C. Añadir a las mezclas de reacción justo antes de introducir las en el termociclador.

- ADN Control
 - **Maize Amplification Control:** Dos viales: 2 x 120 µl
Control de maíz (positivo al gen invertasa). Producto de amplificación de ADN contiene una secuencia del gen invertasa del maíz (10⁶ copias/µl).
 - **BT-176 Amplification Control:** Two vials: 2 x 120 µl
Control de maíz Bt-176™ (positivo al promotor 35S y al gen *cry1Ab*). Producto amplificación de ADN que contiene secuencias del gen *cry1Ab* del maíz Bt-176™ (10⁵ copias/µl) y del promotor 35S (10⁶ copias/µl).

Almacenar a –15±8 °C. Descongelar y manipular en hielo. Evitar ciclos repetidos de congelación /descongelación. Para uso frecuente, distribuya el contenido del vial en alícuotas.

4. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

AVISO IMPORTANTE

Para todos los equipos es necesario una calibración y un mantenimiento regular. Siga las instrucciones del fabricante y revise los parámetros de funcionamiento de forma regular, especialmente para termocicladores y para pipetas. La revisión y calibración continuada de los equipos facilita su funcionamiento correcto, y ayuda a detectar problemas que podrían dar lugar a resultados incorrectos.

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 (Cat. No. 20.033) o equivalente
- 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-Tor catalogue (Cat. No. 40.201/2) o sustancia equivalente para eliminar ADN de superficies de trabajo

Área de amplificación

- Termociclador en tiempo final Eppendorf MasterCycler™ Personal, MJ Research MiniCycler™ o Applied Biosystems GeneAmp™ 2700. El uso de este kit en otros equipos no ha sido testado. Para más información, contacte con nuestro Dept. Técnico (info@biotools.eu)
- Cabina de flujo laminar
- Gradillas para tubos de 0,2 ml
- Tubos de reacción (0,2 ml, pared fina)
- Agua calidad bidestilada estéril o equivalente
- 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

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.

- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor 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 (Cat. No. 20.011/2) o equivalente
- TAE o TBE
- Marcador de DNA de 150 a 700 bp mínimo (Cat. No. 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

5. PROTOCOLO

AVISO IMPORTANTE

Descongele todos los reactivos en hielo y manténgalos en hielo mientras dure su manipulación.

Trabaje en el Área de Pre-amplificación en una cabina de flujo laminar

1.- El volumen final de la reacción es de 50 µl (Amplification Reaction Mixture + DNA purificado). Prepare en diferentes viales de 1.5 ml las mezcla de amplificación "**Amplification Reaction Mixture (35S, Maize, BT cry1Ab Gene)**" siguiendo las instrucciones de la Tabla 1 según el número de muestras que vaya a analizar. Por cada set de reacciones de amplificación incluya al menos un control positivo y un control negativo. Se recomienda preparar una reacción más de las necesarias para asegurarse suficiente volumen para todas las reacciones de amplificación.

Tabla 1. Preparación de las diferentes Amplification Reaction Mixtures (35S, Maize, BT cry1Ab Gene)

Número de reacciones con cada "amplification mixture" = número de muestras + 1 control positivo + 1 control negativo + 1 adicional

AMPLIFICATION REACTION MIXTURE PARA 1 REACCIÓN			
REACTIVO	35S	Maize	BT cry1Ab Gene
MgCl ₂ Solution	2.5 µl	2 µl	2 µl
Master Mix	15 µl	15 µl	15 µl
Polymerase	1.4 µl	1.2 µl	1.6 µl
H ₂ O Estéril bidestilada	21.1 µl	21.8 µl	21.4 µl

2.- Mezcle el volumen necesario de cada reactivo. Mantenga las "amplification reaction mixtures" en hielo.

3.- Distribuya 40 µl de "amplification reaction mixture" en cada vial de amplification.

Añadir el ADN procedente de las muestras y/o de los controles a las mezclas de amplificación en la zona de purificación de ADN del Área de Pre-amplificación para evitar contaminaciones (nunca introducir ADN en la campana de flujo laminar de la zona de preparación de reactivos). La amplificación debe iniciarse en un tiempo máximo de 10 minutos desde que se añade ADN y controles a la mezcla de amplificación.

4.- Añada 50 -100 ng de ADN purificado procedente de las muestras a cada tubo de amplificación y completar con agua estéril bidestilada hasta un volumen final de reacción de 50 µl.

5.- **Control Positivo del Maíz** se debe preparar añadiendo 10 µl del vial Maize Amplification Control + 40 µl de "maize amplification reaction mixture". **Control Positivo de 35S** se debe preparar añadiendo 10 µl del vial BT-176 Amplification Control + 40 µl de "35S amplification reaction mixture". **Control Positivo de Bt-176 cry1Ab gene** se debe preparar añadiendo 10 µl of BT-176 Amplification Control + 40 µl de "BT cry1Ab Gene amplification reaction mixture". Los **Controles Negativos** se preparan añadiendo 10 µl de agua estéril bidestilada a la correspondiente "amplification reaction mixture".

Proceda al Área de Amplificación

6.- Cerrar los tubos de amplificación. Colocar los viales en el termociclador. Almacene el remanente del todos los reactivos a -15±8 °C.

AVISO IMPORTANTE

Compruebe el funcionamiento del termociclador de forma regular. La falta de calibración o calibración deficiente del instrumento puede conllevar la aparición de resultados inexactos.

Siga los programas descritos en la siguiente tabla para cada "amplification reaction mixture":

	35S	Maize	BT cry1Ab Gene
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94°C / 3 min	94°C / 10 min	94°C / 10 min
AMPLIFICACIÓN CÍCLICA	94°C / 30 sec	94°C / 30 sec	94°C / 30 sec
	55°C / 30 sec	70°C / 30 sec	65°C / 30 sec
	72°C / 45 sec	72°C / 30 sec	72°C / 45 sec
NÚMERO DE CICLOS	45	40	50
ELONGACIÓN FINAL	72°C / 3 min	72°C / 10 min	72°C / 10 min

AVISO IMPORTANTE

Este protocolo ha sido adaptado para equipos de amplificación Eppendorf, MJ Research y Applied Biosystems GeneAmp™. Para otros termocicladores, puede ser necesario optimizar los parámetros de la reacción. Para cualquier duda en este aspecto, consulte con nuestro Dept. Técnico (info@biotools.eu).

6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los productos de amplificación se analizan mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de baja EEO (por ejemplo, MB Agarosa, Cat. No. 20.011/2). La visualización de las bandas de amplificación es mejor con geles al 2 % utilizando como buffer TBE 0.5X o al 3 % utilizando como buffer TAE 1X. Se recomienda añadir el bromuro de etidio dentro de la agarosa para una mejor visualización y resolución. Cargue de 10 a 20 µl del producto de amplificación, y proceda a realizar la electroforesis. Las bandas obtenidas poseen una talla pequeña⁵, por lo cual debe tenerse especial cuidado en que la separación entre los productos de amplificación y los dímeros del primer sea suficiente, deje correr el gel pero tenga cuidado de que las bandas no migren hasta el final del gel.

AVISO IMPORTANTE

El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. A la hora de su manejo utilice guantes así como las máximas precauciones posibles.

El resultado para muestras positivas es el indicado:

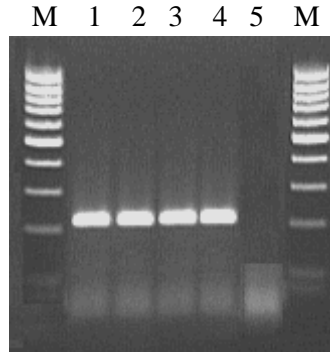
35S Amplification Reaction Mixture	226 bp
Maize Amplification Reaction Mixture	225 bp
BT cry1Ab Gene Amplification Reaction Mixture	184 bp

⁵ Para una buena detección en muestras de alimentos es necesario que los productos de amplificación tengan una talla pequeña, pues el ADN se encuentra altamente fragmentado, llegando a tener un tamaño medio máximo de 400-500 bp. Es por ello fundamental que un método de detección tenga en cuenta este hecho, con el fin de evitar falsos negativos que podrían surgir por utilizar amplificaciones con productos de tamaño superior al fragmento medio encontrado en alimentos.

La detección del promotor 35S es suficiente para clasificar una muestra como GMO. Sin embargo, para asegurar que es maíz Bt-176™, ha de obtenerse un resultado positivo para el gen *cry1Ab*.

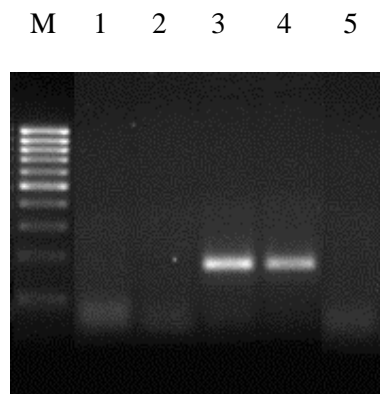
Figura 1: Análisis de la presencia de maíz Bt-176 Maximixer en diferentes muestras de GMO. M: 100 bp molecular ladder (Cat. No 31.006). Carril 1-2: muestra positiva a GMO pero negativa al gen *cry1Ab*. Carriles 2-4: muestras de Maize Bt-176 Maximixer (positivas al gen *cry1Ab*). Carril 5: control negativo de amplificación.

A) Resultados obtenidos con **35S Amplification Reaction Mixture**



Promotor **35S** (226 bp)

B) Resultados obtenidos con **BT *cry1Ab* Gene Amplification Reaction Mixture**



cry1Ab gene (184 bp)

7. CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se lleve a cabo un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo cada vez que se realice un análisis. Al igual que con otras técnicas de laboratorio nuevas, los usuarios noveles deberían considerar llevar a cabo controles adicionales (tanto positivos como negativos) hasta lograr un grado de confiabilidad alto.

Los controles positivos habrán de rendir las bandas correspondientes (ver “Interpretación de Resultados”). Los viales que contienen el control negativo (agua bidestilada estéril) no deben rendir banda alguna. Cualquier análisis que no cumpla estos criterios debe ser totalmente invalidado y descartado. Es necesario repetir el proceso desde el principio, incluyendo la purificación del DNA, y procesar otra alícuota de la muestra original. Un fallo de los equipos durante el test, indicado por mensajes de error, también significa que el test no ha sido válido. Repetir todo el proceso para cada muestra a partir del paso de amplificación.

8. 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 Dept. 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 alicuotear 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.
18. Los laboratorios de Biotools participan regular y satisfactoriamente en ensayos comparativos y pruebas de competencia internacionales (USDA-GIPSA, Gemma Scheme, FAPAS & FEPAS etc.). Por otro lado, Biotools es miembro activo de varios comités internacionales de regulación y estandarización (AENOR, CEN).

9. 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 – Spain. www.biotools.eu