

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

BIOGENICS Kits

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

RoundUp Ready® SOYA IDENTIFICATION KIT Ref. 91.222

Instrucciones 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 BIOGENICS permiten la detección de GMOs (Genetically Modified Organisms, Organismos Modificados Genéticamente, transgénicos) en alimentos frescos y procesados para uso humano y animal. El sistema de detección está basado en la estabilidad de los ácidos nucleicos, que soportan los procesos habitualmente utilizados en la industria (temperatura, vacío, secado, etc.). El kit ha sido ensayado tanto en muestras frescas como altamente procesadas (semillas, hojas, frutos, raíces, harina, galletas, comida enlatada, material liofilizado o texturizado, etc). El DNA es purificado de las muestras, para ser sometido a amplificación y posterior electroforesis en geles de agarosa.

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

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

Utilizando un método de extracción optimizado para muestras alimentarias¹, el DNA se obtiene tanto de muestras frescas como procesadas (recomendamos los kits Speedtools Food DNA Extraction Kit y/o Speedtools Plant DNA Extraction Kit disponibles en nuestro catálogo). La utilización de otros métodos es posible. Sin embargo, el usuario ha de confirmar que el ADN purificado mediante otros métodos es utilizable con el kit (concentración 50-100 ng / µl, $A_{260}/A_{280}=1.8 - 2.0$, ausencia de inhibidores que puedan afectar al resultado de la reacción de amplificación, 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 SOYA se basa en la detección y amplificación de regiones específicas del GMO soja RoundUp Ready®, y no presentes en soja nativa (gen EPSP sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*), así como secuencias genéricas de GMOs (promotor 35S²), presente en aproximadamente el 90 % de los GMOs comercializados hasta la fecha. Asimismo, se incluyen amplificaciones control, con el fin de discriminar un falso negativo debido a inhibición de la amplificación de resultados negativos reales.

El kit BIOGENICS SOYA puede ser utilizado con muestras heterogéneas (más de un componente), y detecta presencia de soja RoundUp Ready®, así como de GMOs que contengan el promotor 35S. Sin embargo, no detecta los GMOs que contienen únicamente el terminador NOS.

REACTIVOS

El kit contiene los reactivos en formato líquido en la cantidad necesaria para poder realizar 48 reacciones de amplificación (Ref. 91.222). Descongele y manipule los reactivos en hielo.

- **Master Mixes**

Soluciones Tris-HCl, contienen: <10 % glicerol, KCl, <0,001 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP y primers. Las Master Mixes incluyen todos los reactivos de amplificación para la amplificación del gen correspondiente, excepto el MgCl₂ y la DNA polimerasa, en las proporciones adecuadas.

- **35S Master Mix:**
para la identificación del promotor 35S (indica presencia de GMO).
- **Soya Master Mix:**
para la identificación de soja (reacción control, indica presencia de soja – gen lectina, presente en soja nativa y en soja 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.

- **EPSP Master Mix:**
para la identificación de soja RoundUp Ready® (indica presencia de soja RoundUp Ready® – gen EPSP sintasa).

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)

Almacenar a -15 ± 8 °C. Descongelar en hielo. Mezclar bien antes de su uso.

- **DNA Polymerase**

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

- **ADN Control**

- **SOYA Amplification Control:**

Control de soja (positivo al gen lectina). Producto amplificado de ADN contiene una secuencia del gen lectina (10^6 copias / μ l).

- **ROUND-READY SOYA Amplification Control:**

Control de Soja ROUND-READY (positivo al gen EPSP sintetasa y al promotor 35S). Producto de amplificación de ADN que contiene secuencias del gen EPSP sintetasa (10^6 copias / μ l) y del promotor 35S (10^6 copias/ μ l).

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.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

AVISO IMPORTANTE

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

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 μ l) 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 μ l) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso

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).

- 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 DNA 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

PROTOCOLO

AVISO IMPORTANTE

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 la **Master Mix correspondiente, MgCl₂, DNA Polimerasa** y **Control Positivo correspondiente** necesarios para el análisis de las muestras y los controles. Se recomienda llevar a cabo un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo en cada ronda de análisis (lo que habrá de ser tenido en cuenta a la hora de calcular el volumen total necesario para llevar a cabo todas las reacciones).

2.- Mezclar el volumen necesario de **Master Mix, MgCl₂ y DNA Polimerasa** según el número de reacciones a llevar a cabo en un tubo de 1,5 ml. **Llevar a cabo este proceso en la campana de flujo laminar.** Mantenga la mezcla de reacción (mezcla de reacción = Master Mix + MgCl₂ + DNA Polimerasa + agua bidestilada estéril) en hielo:

Reactivo	35S	Soya	EPSP
MgCl ₂ Solution	2.5 µl	2 µl	
Master Mix	15 µl		
Polymerase	1.4 µl	1 µl	1.4 µl

3.- Alicuotear 40 µl de mezcla de reacción en cada tubo de reacción de amplificación, **en la campana de flujo laminar.**

4.- Sacar los tubos de la campana de flujo laminar. Añadir 25-50 ng de ADN procedente de las muestras purificadas y/o controles a cada tubo de reacción de amplificación. Completar hasta 50 µl de volumen final.

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

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

	35S	Soya	EPSP synthase
Desnaturalización inicial	94°C / 3 min	94°C / 10 min	94°C / 10 min
Amplificación cíclica	94°C / 30 seg	94°C / 30 seg	94°C / 30 seg
	55°C / 30 seg	60°C / 30seg	59°C / 30 seg
	72°C / 45 seg	72°C / 1 min	72°C / 45 seg
Número de ciclos	45	40	50
Elongación final	72°C / 3 min	72°C / 3 min	72°C / 3 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).

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). 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 la electroforesis. Debido al pequeño tamaño de las bandas obtenidas⁶, ha de tenerse especial cuidado en que la separación entre los productos de amplificación y el primer-dimer sea suficiente, pero tomando precauciones para que las bandas no migren hasta el final del gel.

AVISO IMPORTANTE

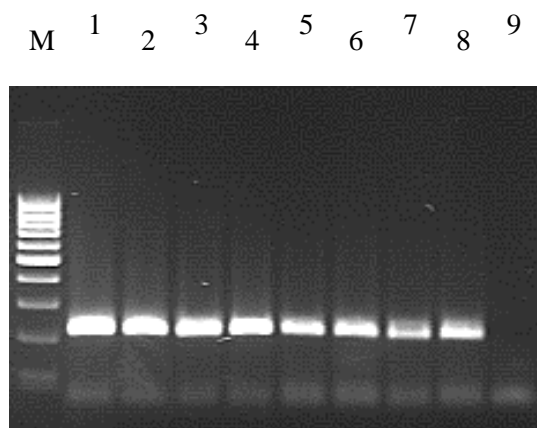
El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. Recomendamos el uso de guantes y las máximas precauciones a la hora de manejarlo.

El resultado para muestras positivas es el indicado:

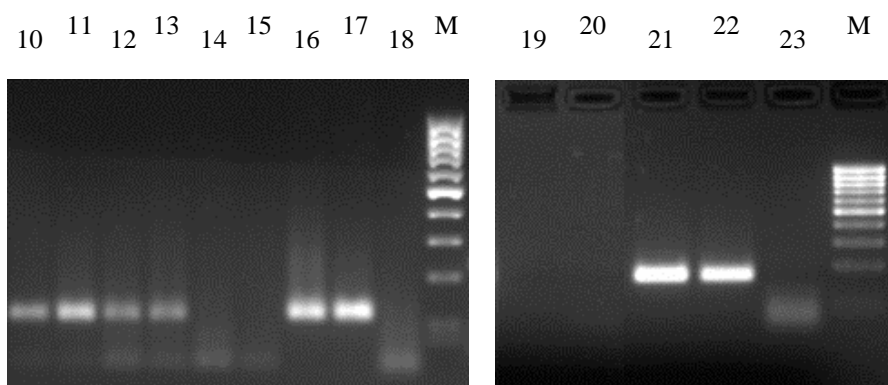
35 S Master Mix	226 bp
Soya Master Mix	118 bp
EPSP Master Mix	172 bp

La detección del promotor 35S es suficiente para clasificar una muestra como GMO. Sin embargo, para asegurar que es soja RoundUp Ready®, ha de obtenerse un resultado positivo para el gen EPSP sintasa.

⁶ Un tamaño pequeño del producto de amplificación es fundamental para una buena detección en muestras alimentarias, donde el DNA 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.



35S Promoter (226 bp)



Soya Control (118 bp)

EPSP Synthase(172 bp)

Figura 1: Análisis del promotor 35S, control de soja y gen EPSP sintasa en diferentes muestras, utilizando en cada caso 10 y 15 μ l de una dilución 10^{-1} . M: 100 bp molecular ladder. Carriles 1, 2: semillas de soja positivas a 35S. 3, 4: harina de soja positiva a 35S. 5, 6: granos de maíz positivos a 35S. 7, 8: control positivo RoundUp Ready®, positivo a 35S. 9: control negativo (no DNA). 10, 11: semillas de soja. 12, 13: harina de soja. 14, 15: granos de maíz. 16, 17: control positivo de soja. 18: control negativo (no DNA). 19, 20: soja positiva a 35S, pero negativa a EPSP (muestras de carriles 1 y 2). 21, 22: muestra positiva a EPSP. 23: control negativo (no DNA).

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.

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. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Los laboratorios de Biotools participan regular y satisfactoriamente en ensayos de intercomparación 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).

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.- www.biotools.eu

BIOTOOLS
BIOTOOLS B & M LABS. S. A.

