

Листівка	Листівка-вкладка	Редакція №1	10.06.2020
			Сторінка 1 з 2



Листівка-вкладка

Мультиплексна тест-система ПЛР-РЧ «Biocore® ГМО-скринінг» р35S / tNOS + ВПК Соя (Кукурудза) призначена для проведення якісного (скринінгового) аналізу з визначення ДНК генетично модифікованих рослин в продуктах харчування, кормах та сільськогосподарській сировині рослинного походження. Рекомендована для дослідження однокомпонентних зразків сої (кукурудзи) або багатокомпонентних зразків, що потенційно можуть містити в своєму складі сою (кукурудзу).

Увага! Тільки для використання у дослідницьких лабораторіях. Не застосовується для діагностичних процедур. Використання в умовах випробувальних лабораторій потребує додаткового проведення процедури валідації.

Загальна інформація:

Тест-системи серії «Biocore® ГМО-скринінг» призначені для визначення послідовностей ДНК, що притаманні більшості зареєстрованих ліній ГМР, методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Тест-системи ПЛР-РЧ «Biocore® ГМО-скринінг» (р35S / tNOS + ВПК Соя) та «Biocore® ГМО-скринінг» (р35S / tNOS + ВПК Кукурудза) є мультиплексними та дозволяють одночасно визначати три мішені: ділянку промотору р35S CaMV (Cauliflower Mosaic Virus), ділянку термінатору tNOS *Agrobacterium tumefaciens*, а також ендogenous контролю ДНК (ВПК – внутрішній позитивний контроль), що є унікальною для сої або кукурудзи. Наявність продуктів ПЛР визначається шляхом реєстрації збільшення рівня флуоресценції за трьома *TaqMan*-зондами, що мічено різними флуоресцентними барвниками.

Тест-системи «Biocore® ГМО-скринінг» валідовано для використання на ампліфікаторах з системою детекції в режимі реального часу: QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, США), Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Німеччина), CFX 96™ (Bio-Rad, США).

Склад:

Тест-система розрахована на 100 реакцій об'ємом 25 мкл. До складу набору входять наступні компоненти:
 ПЛР-РЧ суміш - 2 пробірки об'ємом по 1 мл;
Taq ДНК-полімераза - 1 пробірка об'ємом 0,02 мл;
 НКЗ (негативний контрольний зразок) - 1 пробірка об'ємом 0,160 мл;
 ПКЗ (позитивний контрольний зразок) - 1 пробірка об'ємом 0,160 мл.
 Всі компоненти набору зберігаються при температурі від -24 до -18°C.

Аналітичні характеристики:

Специфічність – відсутність хибно-негативних результатів при дослідженні ГМ ліній рослин, що містять послідовності ДНК р35S, tNOS, та відсутність хибно-позитивних результатів при дослідженні ГМ ліній рослин, в яких ці послідовності не містяться.

Чутливість – 10^3 копій/мл ДНК послідовностей р35S, tNOS, ВПК Сої (Кукурудзи) або не більше ніж 0,01% ГМО.

Увага! Для використання тест-систем серії «Biocore® ГМО-скринінг» лабораторія має відповідати вимогам Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» (Наказ МОЗ України №26 від 24.01.08), бути оснащеною відповідним обладнанням та витратними матеріалами для проведення ПЛР у реальному часі та мати акредитацію згідно ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій».

Етапи проведення аналізу:

Процедура проведення аналізу складається з трьох етапів: пробопідготовки та екстракції ДНК, проведення ПЛР-РЧ, аналізу та інтерпретації отриманих результатів.

1. Пробопідготовка та екстракція ДНК з дослідних зразків

Пробопідготовка досліджуваних зразків передбачає їх попереднє подрібнення або гомогенізацію за допомогою відповідного лабораторного обладнання (млин, блендер, ступка, тощо). Наважка досліджуваного зразка складає від 50 до 200 мг (мкл) в залежності від типу продукту та обраного набору для виділення ДНК.

Екстракція ДНК з досліджуваних зразків проводиться за використання будь-якого комерційного набору згідно інструкції виробника. Процедура валідації тест-систем серії «Biocore® ГМО-скринінг» проводилася за допомогою комерційних наборів GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Кат. № K0791) та DNeasy® mericon Food Kit (Qiagen, Кат. № 69514).

Чистота отриманого препарату ДНК перевіряється за допомогою спектрофотометру шляхом визначення співвідношень довжин хвиль $A_{260/280}$ та $A_{260/230}$, які мають вкладатися у діапазон 1,8-2,0 та 2,0-2,2, відповідно.

Увага! Допускається зберігання виділених зразків ДНК протягом одного тижня при температурі +4-+8°C та до одного року при температурі $\leq -18^\circ\text{C}$.

2. Проведення процедури ПЛР-РЧ

Всі компоненти тест-системи, за виключенням *Taq* ДНК-полімерази, розморожуються, ретельно перемішуються, краплини осаджуються короточасним центрифугуванням на вортексі.

Листівка	Листівка-вкладка	Редакція №1	10.06.2020
			Сторінка 2 з 2

Увага! Уникати потрапляння прямих сонячних променів на компоненти тест-системи. Розморожені компоненти тримати при кімнатній температурі лише протягом часу, необхідного для приготування реакційної суміші. Використовувати лише наконечники з аерозольним бар'єром.

Реакційна суміш готується із розрахунку **19,8** мкл ПЛР-РЧ суміші та **0,2** мкл *Taq* ДНК-полімерази на одну реакцію. Доцільно готувати суміш більше ніж на п'ять реакцій. Суміш ретельно перемішується, краплини осаджуються короткочасним центрифугуванням на вортексі. У ПЛР пробірки (стриповані пробірки, лунки планшету), враховуючи контролю (НКЗ і ПКЗ), розноситься по **20** мкл реакційної суміші. ДНК дослідних зразків, НКЗ і ПКЗ вноситься в кількості **5** мкл у відповідні пробірки.

Увага! Скринінгові дослідження з визначення ГМО на основі аналізування нуклеїнової кислоти регламентуються нормативними документами ДСТУ ISO 21571:2008, ДСТУ ISO 21569:2008, ДСТУ ISO/TS 21098:2009. Згідно вимог ДСТУ ISO кожен досліджуваний зразок аналізується у двох повторах, починаючи з етапу екстракції ДНК.

Прилад для проведення ПЛР-РЧ програмується згідно з інструкцією виробника, під час програмування враховуються наступні параметри:

- об'єм реакційної суміші 25 мкл;
- для приладів лінійки *Applied Biosystems* опцію «пасивний референтний барвник ROX™» відключено;
- канали флуоресценції обрано згідно таблиці 1;

Таблиця 1. QuantStudio™ 5, Rotor-Gene Q та CFX™ 96

Назва мішені	Канали флуоресценції		
	QS 5	RG Q	CFX 96
p35S	JUN	Orange	ROX
tNOS	FAM	Green	FAM
ВПК	VIC	Yellow	VIC

- температурний профіль режиму ампліфікації згідно таблиць 2,3;

Таблиця 2. QuantStudio™ 5 та CFX™ 96

Етап	Цикли	Температура	Час
1	1	95	3 хв
2	45	95	15 сек
3		58*	40 сек

Таблиця 3. Rotor-Gene Q

Етап	Цикли	Температура	Час
1	1	95	3 хв
2	45	95	5 сек
3		58*	20 сек

*Рівень флуоресценції вимірюється на етапі 3

3. Облік та інтерпретація результатів аналізу

Облік результатів ПЛР-РЧ аналізу проводиться за наявності або відсутності графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає. За каналом JUN/Orange/ROX реєструються дані, що

відповідають p35S, за каналом FAM/Green – tNOS, а за каналом VIC/Yellow – ВПК.

Обробка отриманих даних здійснюється згідно інструкції до приладу. Прилад автоматично розраховує порогову (threshold line) та базову (baseline) лінії. За необхідності їх можна виставити у ручному режимі, окремо для кожного каналу. Порогова лінія встановлюється над рівнем «фонові флуоресценції», приблизно посередині логарифмічної фази графіків ампліфікації. Кінець базової лінії (baseline end) задається за 5 циклів до перетину графіком ампліфікації порогової лінії, а початок (baseline start) – за 12 циклів від кінця базової лінії. У деяких випадках початок та кінець базової лінії доцільно задавати с 1 по 3 цикли відповідно.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо контрольні зразки (НКЗ, ПКЗ) відповідають критеріям, наведеним у таблиці 4:

Таблиця 4. Оцінка контрольних зразків

Контрольні зразки	p35S	tNOS	ВПК
НКЗ	Ct \geq 38		Ct \geq 38
ПКЗ	Ct < 38		Ct < 30

Інтерпретація результатів ПЛР-РЧ аналізу щодо визначення ДНК ГМР (ГМО) проводиться згідно таблиці 5:

Таблиця 5. Оцінка результатів ПЛР-РЧ

p35S	tNOS	ВПК	Результат
Ct < 38	Ct < 30		ГМО виявлено
Ct \geq 38	Ct < 30		ГМО не виявлено
Ct \geq 38	Ct \geq 30		Сумнівний результат

У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно, починаючи зі стадії екстракції ДНК.

4. Додаткова інформація

Термін придатності тест-системи 12 місяців з дати виготовлення, за умови належного зберігання всіх компонентів.

Умови зберігання при температурі від -24°C до -18°C. Дозволяється короткочасне (протягом 1-2 діб) зберігання тест-системи при температурі від +2°C до +4°C при транспортуванні.

ТОВ «БІОКОР ТЕКНОЛОДЖІ ЛТД»

Юридична адреса: вул. Петра Болбочана, 4-А, м. Київ, Україна, 01133

Адреса виробництва: Харківське шосе, 48, м. Київ, Україна, 02160;

тел.: +38 (044) 490-47-00, e-mail: info@biocor-tech.com, www.biocor-tech.com