imegenagro
Food Safety

Instrucciones de Uso

imegen® Specific Tuna ID kit

Identificación de especies de atunes
mediante PCR a tiempo real

REF IMG-309

Fabricado por
Instituto de Medicina Genómica SL
Agustín Escardino 9,
Parc Científic de la Universitat de València
46980 Paterna (Valencia, España)
+34 963 212 340 - info@imegen.es
imegen.es

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification
Nº ES063227-1

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación.

Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad especificada en la etiqueta del producto, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

***Nuestros productos están diseñados para uso en investigación**. Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de Imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.*

*Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. El kit **imegen® Specific Tuna ID kit** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada lote fabricado.*

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: *963 212 340*
e-Mail: *tech.support@imegen.es*

imegenagro

Índice

1. *Información General* 4

2. *Finalidad del Producto* 4

3. *Características Técnicas* 5

4. *Requisitos, Advertencias y Precauciones* 6
   - *4.1 Requisitos* 6
   - *4.2 Advertencias y Precauciones* 7

5. *Contenido y Condiciones de Almacenamiento* 7

6. *Equipos y Materiales Necesarios que no se suministran* 8

7. *Protocolo de Ensayo* 9
   - *7.1 Preparación de las reacciones de amplificación* 9
   - *7.2 PikoReal: Configuración del programa de la PCR* 10
   - *7.3 7500 FAST: Configuración del programa de la PCR* 11

8. *Análisis de Resultados* 11

9. *Troubleshooting* 15

10. *Limitaciones* 16

1. Información General

Los túnidos son especies marinas pelágicas y migratorias que se organizan en grandes bancos en los océanos Atlántico, Pacífico e Índico. A siete especies se las denomina atunes mayores por su importancia económica global y por la intensidad de su comercio internacional, gracias a su popularidad en la alimentación de gran parte del mundo. Es por esta razón que resulta de especial importancia la identificación fiable de las especies de valor comercial, con el fin de evitar el fraude y los costes económicos que de él se derivan.

2. Finalidad del Producto

imegen® Specific Tuna ID kit *se ha diseñado para facilitar la detección molecular de especies de túnidos de interés comercial mediante un análisis de PCR a tiempo real. Esta técnica está basada en la amplificación de una muestra de ADN mediante un sistema de cebadores específicos y sondas de hidrólisis (fluoróforos) que permiten la amplificación y detección simultánea de la diana de interés y de un Control Interno de PCR (IPC, internal positive control).*

El kit ***imegen® Specific Tuna ID*** *kit contiene los reactivos necesarios para la detección de las siguientes especies de túnidos mediante amplificación de una región específica del genoma mitocondrial:*

- ***Thunnus alalunga*** *(Bonito del Norte o Albacore)*
- ***Thunnus albacares*** *(Atún claro o Yellow fin tuna)*
- ***Thunnus obesus*** *(Atún patudo o Bigeye tuna)*
- ***Katsuwonus pelamis*** *(Atún listado o Spipjack tuna)*

3. Características Técnicas

imegen® Specific Tuna ID kit *ha sido validado utilizando ADN extraído a partir de muestras animales y vegetales frescas y procesadas.*

La especificidad teórica del ensayo ha sido comprobada mediante comparaciones con la base de datos del NCBI y mediante secuenciación de material de referencia de las especies diana, y se estima en promedio > 97.5%. Así mismo, la especificidad analítica fue testada experimentalmente con ADN de especies de peces, invertebrados acuáticos y mamíferos.

La sensibilidad analítica se ha evaluado mediante el uso de muestras de atún fresco y procesado, y la sensibilidad teórica de los sistemas de amplificación se estima en promedio > 95%.

La repetibilidad y reproducibilidad del ensayo ha sido comprobada experimentalmente utilizando diluciones de ADN de las muestras de interés en ADN vegetal. El límite de detección se ha establecido en un 1% para cada una de las especies de interés, correspondiendo al nivel aceptado para discriminar entre una contaminación accidental y un evento de fraude.

Tabla 1*. Especies animales y vegetales analizadas durante los ensayos de especificidad.*

Master Mix Tuna 1			
Especie	Resultado	Especie	Resultado
T. alalunga	D	*Lubina*	ND
T. albacares	D	*Lenguado*	ND
T. obesus	ND	*Bacalao*	ND
K. pelamis	ND	*Merluza*	ND
T. thynnus	ND	*Sardina*	ND
Almeja	ND	*Rape*	ND
Cangrejo	ND	*Trucha*	ND
Cigala	ND	*Emperador*	ND
Gamba	ND	*Vaca*	ND
Pulpo	ND	*Cerdo*	ND
Sepia	ND	*Caballo*	ND
Anguila	ND	*Cabra*	ND
Limanda	ND	*Oveja*	ND

Master Mix Tuna 2			
Especie	Resultado	Especie	Resultado
T. alalunga	ND	*Lubina*	ND
T. albacares	ND	*Lenguado*	ND
T. obesus	D	*Bacalao*	ND
K. pelamis	D	*Merluza*	ND
T. thynnus	D *	*Sardina*	ND
Almeja	ND	*Rape*	ND
Cangrejo	ND	*Trucha*	ND
Cigala	ND	*Emperador*	ND
Gamba	ND	*Vaca*	ND
Pulpo	ND	*Cerdo*	ND
Sepia	ND	*Caballo*	ND
Anguila	ND	*Cabra*	ND
Limanda	ND	*Oveja*	ND

D: Detectado
ND: No Detectado

** El sistema de amplificación de T. obesus amplifica el ADN de T. thynnus.*

La interpretación de estos resultados viene detallada en la Sección 8. Análisis de Resultados (Tabla 7, Página 13).

4. Advertencias, Precauciones y Requisitos

1. Seguir estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los residuos de reactivos a la red de agua potable. Utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad de los materiales de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición a Imegen.
8. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental o biológica.
9. Este kit ha sido validado con unos equipos y condiciones determinadas que podrán variar en otros laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio realice una validación interna previa al uso del kit por primera vez.

5. Contenido y Condiciones de Almacenamiento

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 determinaciones e incluye los siguientes reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones de PCR:

- ***Máster Mix Tuna específicas**. Contiene los cebadores y sondas de hidrólisis específicas para cada reacción de PCR:*
  - *Master Mix Tuna 1: Thunnus alalunga / Thunnus albacares*
  - *Master Mix Tuna 2: Thunnus obesus / Katsuwonus pelamis*

- ***Máster Mix General.** Contiene la ADN polimerasa, los dNTPs y el tampón de PCR.*

- ***Controles Positivos (pescado crudo)**. Los controles positivos se han preparado a partir de extracciones de ADN de pescado crudo, y contienen un 1% de ADN de cada especie de interés diluida en ADN vegetal.*
  - *Control Positivo Tuna 1: Thunnus alalunga / Thunnus albacares*
  - *Control Positivo Tuna 2: Thunnus obesus / Katsuwonus pelamis*

Tabla 2**. Componentes del kit y temperatura de conservación del kit **imegen® Specific Tuna ID kit

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Master Mix Tuna 1	Disco morado	360 µl	-20ºC
Master Mix Tuna 2	Disco amarillo	360 µl	-20ºC
Master Mix General	Disco blanco	2 x 600 µl	-20ºC
Control Positivo Tuna 1 (1%)	Tapón morado	60 µl	-20ºC
Control Positivo Tuna 2 (1%)	Tapón amarillo	60 µl	-20ºC

6. Equipos y Materiales necesarios que no se suministran

En la siguiente tabla se muestran los equipos requeridos para el uso del kit ***imegen®*** ***Specific Tuna ID kit****:*

Equipos	
1	Termociclador de PCR a Tiempo Real (Canales FAM, VIC y Cy5)
2	Micropipetas (10 µL, 20 µL y 200 µL)
3	Vórtex

Materiales	
1	Tubos estériles de 0.2 mL
2	Tubos estériles de 1.5 mL
3	Guantes de látex sin polvo

7. Protocolo de Ensayo

7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

Determinar el número de amplificaciones que se van a realizar, se recomienda al menos incluir un control negativo y un control positivo en cada tanda de amplificación.

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

1. Descongelar completamente todos los reactivos necesarios: Master Mix Tuna 1, Master Mix Tuna 2, Master Mix General, Control Positivo y las muestras de ADN. Dar un vórtex y spin a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. En un tubo de 1.5 ml, añadir los siguientes reactivos para cada una de las máster mixes específicas:

Tabla 3. Cantidad de reactivos necesaria por reacción de PCR.

Reactivos	Cantidad por reacción
Master Mix Tuna	7.5 µL
Master Mix General	12.5 µL

3. Dar vórtex y spin a cada uno de los dos tubos de 1.5 ml.
4. Dispensar 20 µl de estas mixes de PCR en cada uno de los tubos o pocillos donde se vaya a realizar la reacción de amplificación.
5. Por último, añadir 5 µl del ADN de cada una de las muestras que se quiera analizar. La concentración óptima de la muestra debe ser de 10 ng/µl para que los resultados sean comparables con el Control Positivo de PCR.
6. Así mismo, añadir 5 µl de agua libre de nucleasas en el control de PCR (NTC), 5 µl del control de extracción y 5 µl del Control Positivo en los pocillos o tubos correspondientes.

7.2 PikoReal: Configuración del programa de la PCR

Para llevar a cabo la PCR, se deberán seguir las siguientes instrucciones en la opción de "Setup" del termociclador.

- ***Propiedades del Experimento:***

  Fluoróforos:

FAM	*T. alalunga & T. obesus*
YY	*T. albacares & K. pelamis*
CY5	*IPC*

- ***Programa de PCR a tiempo real:***

Tabla 4. *Programa de PCR a tiempo real óptimo para el PikoReal Real-Time PCR System.*

Campos	Etapa 1	Etapa 2	
	Activación enzimática	PCR	
Nº de Ciclos	1 Ciclo inicial	36 ciclos	
		Desnaturalización	Annealing / Extensión
Temperatura	95ºC	95ºC	60ºC
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

*
Detección de fluorescencia

- ***Análisis:***
  Para el análisis de resultados se recomienda establecer el Threshold manual y el Baseline en el rango de ciclos "Cycle Range 3 – 10" para minimizar la señal residual en los canales de detección.

7.3 7500 FAST: Configuración del programa de la PCR

Para llevar a cabo la PCR, se deberán seguir las siguientes instrucciones en la opción de "Setup" del termociclador.

- ***Propiedades del Experimento:***

  Tipo de Experimento: Quantitation – Standard Curve
  Reactivos de Detección: TaqMan Reagents
  Velocidad de la Rampa: Standard (2 hours)

- ***Plate Setup:***

T. alalunga	*Reporter (FAM) Quencher (MGB)*
T. albacares	*Reporter (VIC) Quencher (MGB)*
T. obesus	*Reporter (FAM) Quencher (MGB)*
K. pelamis	*Reporter (VIC) Quencher (MGB)*
IPC	*Reporter (Cy5) Quencher (Select "None")*

- ***Programa de PCR a tiempo real:***

Tabla 5. *Programa de PCR a tiempo real óptimo para el 7500 FAST Real-Time PCR System.*

Campos	Etapa 1	Etapa 2	
	Activación enzimática	PCR	
Nº de Ciclos	1 Ciclo inicial	36 ciclos	
		Desnaturalización	Annealing / Extensión
Temperatura	95ºC	95ºC	60ºC
Tiempos	10 minutos	15 segundos	1 minuto*

** Detección de fluorescencia*

- ***Análisis:***
  Para el análisis de resultados se recomienda establecer el "Threshold" en 0.2 y mantener en posición automática la opción "baseline" para minimizar la señal residual en los canales de detección.

  Ct Settings:

Threshold	*0.2*
Baseline	*AUTO*

8. Análisis de Resultados

El Ct y el cut-off son parámetros relativos directamente influenciados por el nivel del umbral o threshold. Por ello, se recomienda analizar cuidadosamente las señales en cada uno de los canales de detección (FAM, VIC/YY y Cy5) para establecer el threshold al comienzo de la fase exponencial y a un nivel superior a cualquier señal residual.

***RECUERDE!** Establecer el threshold en 0.2 en el 7500 FAST Real-Time PCR System y ajustarlo de modo manual en el PikoReal Real-Time PCR System para minimizar la señal residual.*

Se recomienda analizar tanto el Ct "threshold cycle" como la forma de la curva de amplificación para cada muestra y comprobar que los resultados obtenidos para los controles son los esperados:

- ***Control positivo (ADN atún):** El resultado debe ser siempre positivo para todas las reacciones en las que se ha utilizado el control positivo como "template", tanto el canal FAM como en el VIC/YY.*
- ***IPC (Internal Positive Control):** El resultado debe ser positivo en el canal Cy5 en todas las reacciones de amplificación, incluyendo el control de PCR (NTC) y los controles positivos.*
- ***Controles negativos**: Sólo debe haber amplificación en el canal Cy5® donde se detecta el control positivo interno (IPC), que determina la ausencia de inhibición en la muestra.*

IPC

Debe comprobarse que el IPC (Cy5®) sea positivo en todas las muestras. Un resultado negativo en el IPC indicaría la presencia de inhibidores de PCR en la muestra. Nótese además que el resultado del IPC podría ser negativo en aquellas muestras saturadas con mucho ADN de atún.

Atún

La siguiente tabla muestra gráficamente los resultados que pueden obtenerse a partir del análisis de una muestra, así como la interpretación que debería hacerse a partir de los mismos:

Tabla 5. *Interpretación de resultados del ensayo de PCR a tiempo real.*

Master Mix Tuna		Interpretación
Atún	IPC	
-	+	No se detecta ADN de atún
+	+	Se detecta ADN de atún
-	-	Presencia de inhibidores de PCR en la muestra*
+	-	Muestra con exceso de ADN de atún

**Si se detecta la presencia de inhibidores en la muestra, recomendamos comprobar si se debe a un exceso de ADN en la reacción que pueda estar saturando la PCR (el máximo recomendado son 250ng). Si la cantidad de ADN es correcta, se recomienda entonces repetir la extracción de ADN. Si el problema persiste, por favor, contacte con nuestro departamento técnico.*

La presencia de atún en la muestra viene indicada por la señal de amplificación en los canales FAM y VIC/YY siempre que el valor de Ct sea inferior o igual al $Ct_{cut\text{-}off}$.

Tabla 6. *Detalles de los fluoróforos utilizados para marcar cada una de las especies de atún.*

Mix Específica	FAM	VIC (YY)
Master Mix Tuna 1	*Thunnus alalunga*	*Thunnus albacares*
Master Mix Tuna 2	*Thunnus obesus*	*Katsuwonus pelamis*

El $Ct_{cut\text{-}off}$ *es el valor establecido que permite determinar si una reacción de amplificación es positiva o negativa y este corresponde con el valor de Ct obtenido en el Control Positivo para cada una de las especies analizas. Se recomienda analizar el Control Positivo en cada determinación debido a la variabilidad entre ensayos.*

$$Ct_{\text{Cut-off}} = Ct_{\text{Control Positivo (1\%)}}$$

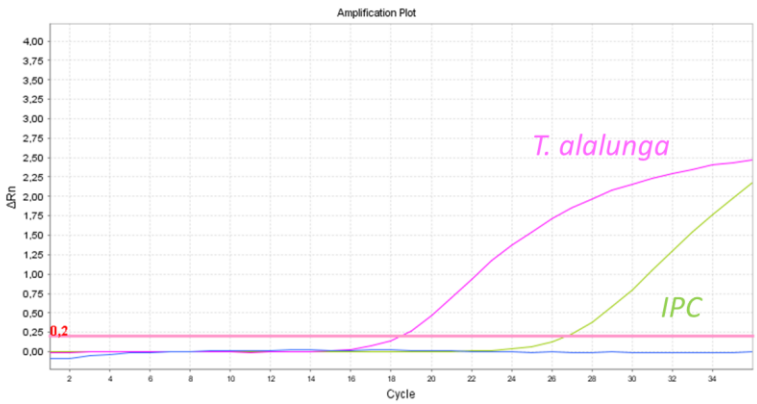
Tabla 7. Interpretación de resultados del ensayo de PCR a tiempo real.

Analito	Resultado	Interpretación
ADN de interés	No amplificación	No Detectado
	Ct > Cut-off	No Detectado
	Ct ≤ Cut-off	Detectado
Control de PCR / Control de extracción	Ct > Cut-off o no amplificación	No Detectado - Resultados esperados

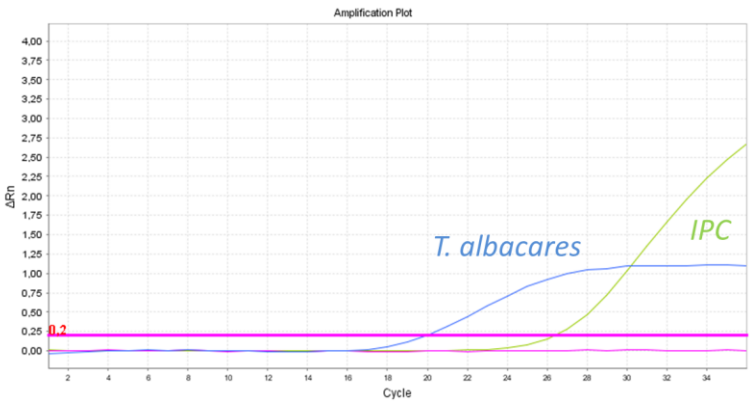
Nota: cualquier muestra con un Ct igual al $Ct_{cut-off}$ contiene aproximadamente un 1% de ADN de atún.

Master Mix Tuna 1:

*Muestra Positiva (FAM): **100% T. alalunga** (50 ng de ADN total por reacción)*

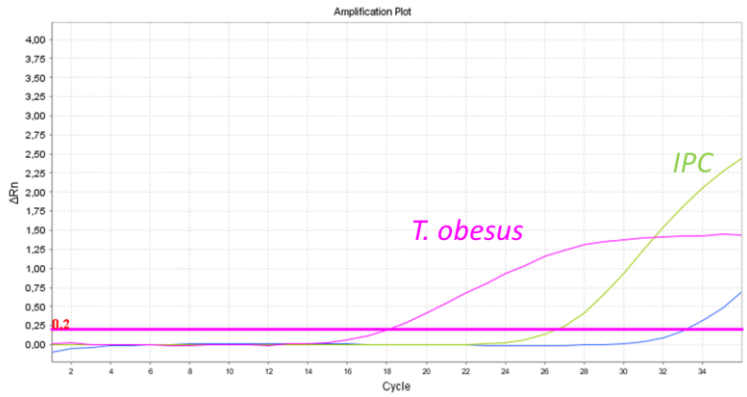


*Muestra Positiva (VIC): **100% T. albacares** (50 ng de ADN total por reacción)*

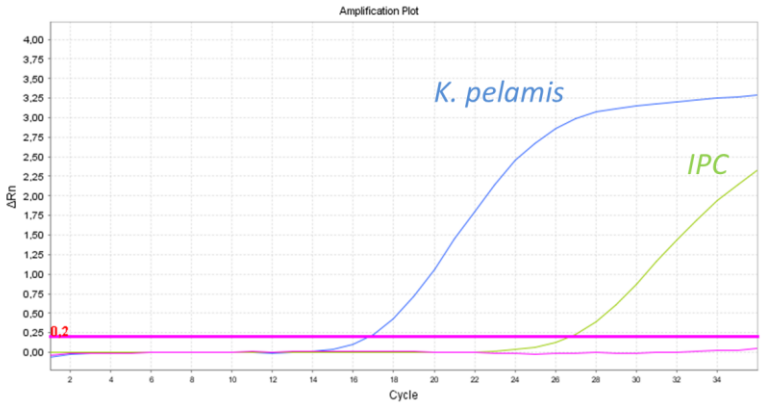


<u>*Master Mix Tuna 2*</u>*:*

*Muestra Positiva (FAM): **100% T. obesus** (50 ng de ADN total por reacción)*



*Muestra Positiva (VIC): **100% K. pelamis** (50 ng de ADN total por reacción)*



9. Troubleshooting

La tabla que aparece a continuación presenta gráficamente los resultados que podrían obtenerse del análisis de los diferentes controles en un ensayo, así como su interpretación:

Tabla 6. *Interpretación de los posibles resultados*

Control	Master Mix Tuna		Causa
	Tuna	IPC	
Control Positivo	+	+	Resultado esperado
	-	-	Fallo de amplificación en la PCR[1]
Control Negativo de Extracción	-	+	Resultado esperado
	+	+	Contaminación durante la extracción de ADN[2]
Control Negativo de PCR	-	+	Resultado esperado
	+	+	Contaminación de la PCR con ADN de atún[3]

[1] ***Fallo de amplificación en la PCR:*** *Compruebe el programa de amplificación y la configuración de captura de la fluorescencia. Un fallo en la amplificación puede deberse a un problema técnico en la configuración del programa de PCR.*

[2] ***Contaminación en el proceso de extracción de ADN:*** *La contaminación puede producirse por diversos errores cometidos durante el manejo de las muestras, por el uso de reactivos contaminados o por contaminación ambiental. Revise el protocolo de extracción de ADN, limpie el laboratorio donde se ha realizado la extracción y evite cualquier posibilidad de contaminación durante la homogeneización de la muestra. Si es necesario, utilice nuevas alícuotas de los reactivos de extracción de ADN.*

[3] ***Contaminación de la PCR con ADN de atún:*** *La contaminación de la PCR puede deberse a un manejo equivocado de la muestra, al uso de reactivos contaminados o a contaminación de origen ambiental. Limpie minuciosamente el laboratorio donde se ha preparado la PCR, así como los equipos y el material utilizados. Si es necesario, use alícuotas nuevas de los reactivos de PCR. Prepare en último lugar la reacción de PCR que contiene el control positivo, con el fin de evitar la contaminación cruzada.*

10. Limitaciones

10.1 Equipos

imegen® Specific Tuna ID kit *ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR a tiempo real:*

- *PikoReal™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)*
- *7500 FAST Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific)*

Si usa otra marca o modelo de termociclador, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

10.2 Reactivos

Se recomienda utilizar los reactivos de PCR recomendados por el proveedor del termociclador que se vaya a utilizar para los ensayos de PCR a tiempo real. En caso de duda, por favor contacte con nuestro servicio técnico.

10.3 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.