

Aspectos sobresalientes

- Límite de detección 0.5% (1 semilla transgénica en 200 semillas convencionales; o 2 semillas transgénicas en 400 semillas convencionales)
- Resultados en 10 minutos o menos
- Disponible en kits de 100 tiras, o en empaques de alto volumen

Contenido del Kit

- 100 tiras QuickStix empacadas en 2 tubos disecantes resistentes a la humedad
- 100 pipetas desechables
- 100 frascos de reacción desechables
- Buffer EB7 concentrado 15x

Materiales Requeridos No Incluidos:

- Triturador marca Waring modelo 31BL91 (o su equivalente)
- Adaptador para la jarra de vidrio (marca Eberbach modelo E8495)
- Jarra de vidrio
- Tapa protectora de plástico para cubrir la jarra de vidrio mientras la trituradora esté prendida.
- Cilindro graduado (para disolver el Buffer)

Número de Catálogo AS 003 AP

Propósito del Kit

El Kit de EnviroLogix “QuickStix AP para Cry1Ac en Semilla de Algodón” ha sido diseñado para extraer y detectar la presencia adventicia de la proteína Cry1Ac en los niveles que son típicamente expresados en semilla de algodón transgénico. La secuencia genética que produce la proteína Cry1Ac deriva del microorganismo *Bacillus thuringiensis*, comunmente denominado “Bt”.

Basado en pruebas realizadas con semillas Bollgard®, el límite de detección de este Kit es 0.5% (1 semilla positiva en un lote de 200 semillas convencionales, o 2 semillas positivas en un lote de 400 semillas convencionales). El Kit descrito en este protocolo no fué diseñado para realizar pruebas con tejido vegetal (hojas de algodón) o con semillas individuales. En ese caso el Kit aplicable es el que lleva el número de catálogo AS 003 LS.

NOTA: Si esta prueba arroja un resultado negativo en extracto de semilla de algodón, no elimina la posibilidad de que exista algún *otro* material transgénico en la muestra, que no sea Cry1Ac.

Como Funciona la Tira

Para detectar la proteína Cry1Ac con este Kit, en primer lugar se debe triturar la muestra compuesta de semillas deslintadas y luego mezclarla con el Buffer, con el fin de extraer y solubilizar la proteína de interés.

En cada punta de las Tiras *QuickStix* hay una “almohada” absorbente recubierta por una cinta protectora. La punta de la Tira que debe insertarse dentro del frasco de reacción es la punta que presenta una flecha impresa en la cinta protectora. La muestra fluye hacia arriba sobre la membrana de la Tira y se absorbe por la almohada ubicada en la parte superior de la misma.

La parte central de la Tira -ubicada entre la cinta con la flecha y la almohada absorbente en la cabecera- es donde se observan los resultados de las reacciones descritas a continuación bajo el título “Interpretando los Resultados”.

Evite doblar las Tiras.

Preparación de las Muestras

Para preparar el Buffer, mezcle la botella entera del concentrado 15x con 14 litros de agua destilada o desionizada. Almacene el Buffer a temperatura ambiente.

1. En función de la cantidad de semillas que se vaya a muestrear, el siguiente cuadro indica el tamaño de jarra que se debe utilizar, el lapso apropiado para el triturado y el volumen de Buffer que se debe añadir.

Tipo de semilla	Tamaño de la muestra	Tamaño de la jarra (onzas)	Lapso del triturado (segundos)	Volúmen de Buffer (mL)
Algodón deslintado	200 semillas	4	20	60 ±5
	400 semillas	8	20	140 ±5



Jarras de 4 y 8 onzas



Al llenar la pipeta, evite las partículas sedimentadas al fondo de la jarra



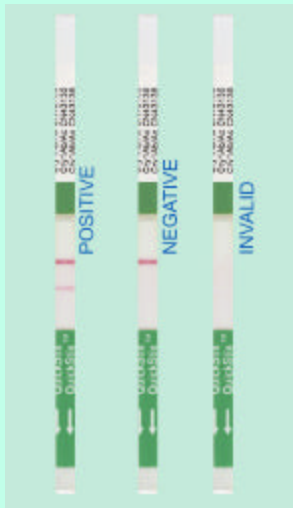
2. Elija la jarra del tamaño que corresponda al tamaño de la muestra; cuente el número apropiado de semillas; vacíe las semillas dentro de la jarra; enrosque el adaptador y la hojilla rotativa a la jarra, como si fuese su tapa. El adaptador y la hojilla rotativa se ensamblan con un sello de caucho en forma de aro (el aro viene con el adaptador).
3. Una vez que el adaptador y la hojilla rotativa están bien enroscados a la jarra, invierta el conjunto, encájelo sobre la trituradora y coloque la tapa protectora de plástico encima de la jarra (vea la foto superior a mano izquierda).
4. Utilizando el triturador en alta velocidad, triture la muestra durante 20 segundos; luego retire la jarra de la trituradora y desenrosque el adaptador.
5. Agregue el volumen apropiado de Buffer al contenido triturado que está dentro de la jarra. El volumen apropiado está indicado en el cuadro arriba, en función del tamaño de la muestra triturada y el tamaño de la jarra correspondiente.
6. Cierre la jarra con su tapa normal y sacúdala vigorosamente por unos 10-15 segundos hasta que la muestra triturada esté totalmente inundada por el líquido. Antes de retirar líquido de la jarra para correr la Tira, deje que la jarra quede inmóvil sobre el mesón de trabajo por aproximadamente un minuto, hasta que el sedimento se haya reposado al fondo (vea la foto a mano izquierda).
7. Una vez que el sedimento esté reposado al fondo de la jarra, sin mover la misma, utilice la pipeta desechable para succionar el líquido libre de sedimentos en la parte superior de la jarra. Llene la pipeta hasta la línea indicadora que está trazada en el costado superior del embudo de la pipeta (vea la foto a mano izquierda). Vacíe el contenido de la pipeta dentro del frasco de reacción (vea la foto superior en la próxima página).
8. **IMPORTANTE:** Para evitar contaminación cruzada, inmediatamente después de trabajar con cada muestra es imprescindible limpiar a fondo la jarra de vidrio, la trituradora, sus componentes y el mesón de trabajo, así eliminando totalmente residuos asociados a la muestra anterior. Las pipetas y frascos de reacción son desechables y deben botarse inmediatamente después de su primer uso. Cada muestra requiere el uso de una nueva pipeta y un nuevo frasco de reacción.
9. Este Kit arroja los mejores resultados cuando la Tira se corre inmediatamente después del proceso de extracción descrito en los susodichos puntos 4, 5 y 6.

Como Correr la Tira QuickStix

1. Antes de abrir el tubo disecante refrigerado que empaqua las Tiras, permita que el mismo llegue a temperatura ambiente. Saque solamente la Tira a ser utilizada de inmediato. Evite doblar las Tiras. Vuelva a cerrar el tubo disecante inmediatamente después de sacar la Tira a ser utilizada.
2. Coloque la Tira dentro del frasco de reacción una vez completado el paso # 7 en la sección anterior "Preparación de las Muestras". La muestra fluirá hacia la parte superior de la tira. Los frascos de reacción se pueden parar solos o dentro de los recortes de la gradilla de cartulina que viene incluida en el Kit.
3. La Tira debe desarrollarse por 10 minutos completos dentro del frasco de reacción. Luego sáquela del frasco para interpretar los resultados. Resultados positivos son capaces de manifestarse de manera obvia antes de los mencionados 10 minutos.
4. Para preservar la Tira reaccionada, corte y deseche la parte inferior de la Tira que está recubierta por la cinta protectora con la flecha. Hecho esto, se recomienda pegar la Tira (utilizando tape común y corriente) dentro de un cuaderno de laboratorio.



Vacíe la pipeta dentro del frasco de reacción y coloque la tira dentro del mismo por 10 minutos

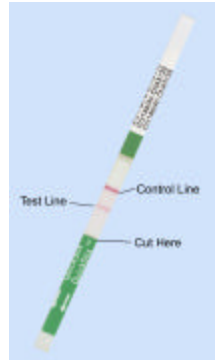


Cualquier "Línea de Resultados" rosada que aparezca debe interpretarse como un resultado positivo



Interpretando los Resultados

Los resultados de las Tiras reaccionadas se interpretan mediante lectura de dos líneas de color rosado que aparecen en la sección central de la Tira, según se observa en la siguiente fotografía.



La "Línea de Control" es la superior y la "Línea de Resultados" es la inferior.

La única función de la "Línea de Control" es indicar que la Tira funcionó correctamente. Por ende la "Línea de Control" *siempre* debe manifestarse en una Tira reaccionada. En dado caso que la "Línea de Control" no se manifiesta, la Tira debe considerarse inválida y la prueba debe repetirse con una Tira nueva.

La función de la "Línea de Resultados" es indicar si una muestra es positiva o negativa para la proteína de interés, Cry1Ac.

Si una muestra contiene Cry1Ac en cualquier cuantía que sea igual o mayor al límite de detección del 0.5%, la "Línea de Resultados" se manifestará, indicando que la muestra se debe considerar positiva. En cambio, si después de transcurrido el período de reacción de 10 minutos, la "Línea de Resultados" no se manifiesta, eso significa que la muestra no contiene la proteína de interés (Cry1Ac) o la contiene en una cuantía inferior al límite de detección.

Independientemente de lo que ocurra en la "Línea de Resultados", la "Línea de Control" siempre debe manifestarse, indicando que la Tira funcionó correctamente.

Almacenaje del Kit

Las Tiras QuickStix pueden almacenarse a temperatura ambiente, o bajo refrigeración para maximizar su vida útil. Las fechas de vencimiento que corresponden a la temperatura de almacenaje están marcadas en la caja de cada Kit. El Kit puede utilizarse en campo; sin embargo, su exposición prolongada a elevadas temperaturas puede afectar los resultados de manera negativa. No abra los tubos desecantes donde se encuentran empacadas las Tiras, hasta que la prueba se vaya a correr.

Precauciones y Limitaciones

- Este kit está diseñado para detectar presencia o ausencia únicamente, y no pretende ser cuantitativo.
- Este Kit no sirve para realizar pruebas con otros cultivos que no sean algodón, ni para realizar pruebas con tejido vegetal (hojas de algodón) o con semillas individuales. Para detectar la proteína Cry1Ac en tejido vegetal o semillas individuales, el Kit aplicable es el que lleva el # de catálogo AS 003 LS.
- Según se acostumbra con toda prueba, es recomendable que los resultados sean confirmados por un método alternativo cuando sea necesario.
- Este kit diagnóstico ha sido diseñado para ser utilizado exclusivamente con el Buffer de extracción y el protocolo proporcionado con el Kit. El uso de otras soluciones y/o protocolos puede invalidar los resultados de la prueba.
- Los resultados generados mediante el uso apropiado de este Kit reflejan la condición de la muestra directamente ensayada. Cualquier inferencia que se haga en cuanto a la condición del material de origen debe descansar sobre la premisa que se esté aplicando procedimientos de muestreo y cálculos estadísticos válidos, y que se

esté tomando en consideración el posible impacto del azar y la incertidumbre asociada a todo sistema de ensayo. Un resultado negativo obtenido con una prueba correctamente realizada no significa necesariamente que el material de origen es enteramente negativo.

- No exponga el Kit a la luz directa del sol, ni déjelo dentro de un vehículo. No exponga los componentes del Kit a temperaturas extremas.
- Si se almacenan las Tiras bajo refrigeración, permita que los tubos desecantes refrigerados alcancen temperatura ambiente antes de usar las Tiras.
- Evite doblar las Tiras.
- Ningunos componentes del Kit deben utilizarse después de su fecha de vencimiento.
- **Atención: altos niveles de contaminación pueden manifestarse en la “Línea de Resultados” en tan sólo 2 minutos. En cambio, muestras contaminadas al límite de detección (o cerca del mismo) pueden tardar 10 minutos en manifestarse. Por ende la Tira debe permanecer dentro del frasco de reacción durante los 10 minutos reglamentarios antes de interpretar los resultados.**



Para Soporte Técnico
Contáctenos en:

EnviroLogix
500 Riverside Industrial
Parkway
Portland, Maine
04103-1486 USA

Tel: (207) 797-0300
Fax: (207) 797-7533

e-mail:
info@envirologix.com

Página web:
www.envirologix.com



GARANTIA LIMITADA

EnviroLogix Inc. (“EnviroLogix”) garantiza los productos vendidos conjuntamente con este instructivo (“los Productos”) contra defectos en los materiales y en cuanto a la calidad de mano de obra cuando estén utilizados antes de la fecha de vencimiento indicada en su empaque y de acuerdo a las instrucciones aplicables. En el caso de que los Productos no estén conformes a esta Garantía Limitada y el cliente notifica EnviroLogix por escrito de dichos defectos durante el plazo de la garantía, incluyendo una oferta por el cliente de devolver los Productos a EnviroLogix para su evaluación, EnviroLogix a su opción reparará o reemplazará cualquier producto o parte del mismo que demuestra tener defectos en los materiales o en la calidad de mano de obra dentro del plazo de la garantía.

ENVIROLOGIX OTORGA NINGUNA OTRA GARANTIA, SEA EXPLICITA O IMPLICITA, INCLUYENDO SIN LIMITACION CUALESQUIERA GARANTIAS IMPLICITAS DE INDOLE COMERCIAL O DE USO.

La garantía otorgada mediante este instrumento y los datos, especificaciones y descripciones de los productos de EnviroLogix que aparecen publicados en sus catálogos y demás literatura oficial son las únicas representaciones realizadas con respecto a los Productos y la Garantía. Con la salvedad de declaraciones escritas firmadas por un funcionario debidamente autorizado por EnviroLogix Inc., ningunas otras declaraciones o representaciones, escritas u orales, realizadas por empleados, agentes o representantes de EnviroLogix son válidas, no constituyen parte de la garantía otorgada mediante este instrumento, no constituyen una parte del convenio de compra-venta y no deben considerarse fiables.

EnviroLogix no garantiza contra daños o defectos causados por el mal manejo, transporte, accidentes o el uso indebido o anormal de los Productos, contra defectos en productos o componentes no fabricados por EnviroLogix, ni contra daños causados por dichos componentes no fabricados por EnviroLogix. EnviroLogix le cede al cliente la garantía recibida (si existe) del fabricante de dichos productos o componentes. Esta garantía tampoco aplica a los Productos que hayan sufrido cambios o modificaciones realizadas o intentadas por personas que no estuviesen expresamente autorizadas por EnviroLogix.

ESTA GARANTIA ES EXCLUSIVA. La única y exclusiva obligación de EnviroLogix será de reparar o reemplazar los productos defectivos en la manera y el plazo antes mencionado. Con respecto a los Productos o cualquier parte de los mismos EnviroLogix no asume ni asumirá ninguna otra obligación, independientemente de que sea derivada del mismo convenio de compra-venta, agravio (“tort”), responsabilidad estricta (“strict liability”) o cualquier otra base.

Bajo ninguna circunstancia EnviroLogix se responsabilizará por daños consecuentes, especiales o incidentales independientemente de que sean basados en esta Garantía Limitada o no.

Esta Garantía Limitada expresa la totalidad de la obligación de EnviroLogix con respecto a los Productos. Si se determina que cualquier parte de esta Garantía Limitada es inaplicable o ilegal, el resto de la misma permanecerá en plena vigencia.

*Bollgard® es una marca registrada de Monsanto Technology LLC
EnviroLogix, el logo de EnviroLogix y QuickStix™ son marcas registradas de
EnviroLogix Inc.*

© EnviroLogix 2006