

Destaques:

- Utilizar este Kit com o Método Comum de Extração™
- Resultados em até 5 minutos
- Kit disponível com 100 tiras no formato individual, em pacotes ou em QuickCombs™

Conteúdo do kit:

- 100 tiras QuickStix embaladas em dois recipientes dessecantes
- 100 tubos de reação descartáveis
- 100 pipetas de transferência descartáveis

Itens não fornecidos:

- Triturador Waring, modelo 31BL91 (ou equivalente)
- Adaptador para jarra (Eberbach nº E8495)
- Jarra de vidro com tampa
- Protetor para a jarra do triturador
- Proveta graduada
- Água

Número de catálogo AS 016 BG

Aplicação do Kit

O Kit EnviroLogix QuickStix para grãos de milho Herculex extrai e detecta a presença de proteínas Cry1F em milho Herculex I e HERCULEX XTRA. A sensibilidade do kit para Cry1F é de 0.5% baseado em testes efetuados com milho Herculex I (ou seja, um grão de milho Herculex I em 200 grãos convencionais). Para a detecção de Cry1F em folhas e sementes individuais de milho, utilizar tiras QuickStix Cat# AS 016 LS.

Funcionamento do Teste

Culturas de milho geneticamente modificadas com o gene *cry1F* expressam a proteína Cry1F em seu tecido. Para detectar a proteína Cry1F, as amostras devem ser primeiramente trituradas e extraídas em água de torneira para a solubilização da proteína.

Cada tira QuickStix possui uma almofada de absorção em cada extremidade. A fita de proteção com a seta indica qual extremidade da tira deve ser inserida no tubo de reação. A amostra flui no sentido de baixo para cima, sendo absorvida na parte superior pela almofada de absorção. A reação poderá ser vista na região entre a fita de proteção e a almofada de absorção da tira conforme descrito em “Interpretando os Resultados.” Evitar dobrar as tiras.

Preparo das Amostras

Passo 1: Determinação do Número e o Tamanho das Sub-amostras

1. Preparar uma composição de amostra de acordo com as instruções da USDA / GIPSA, encontradas nas referências dos seguintes documentos:
 - <http://www.archive.gipsa.usda.gov/reference-library/handbooks/grain-insp/grbook1/bk1.pdf> - USDA Grain Inspection Handbook, Book 1, Grain Sampling (Amostragem de Grãos).
 - <http://www.archive.gipsa.usda.gov/biotech/sample2.htm> - Guidance document entitled Sampling for the Detection of Biotech Grains. (Guia Amostragem para Detecção de Grãos em Biotecnologia).
 - <http://www.archive.gipsa.usda.gov/biotech/sample1.htm> - Practical Application of Sampling for the Detection of Biotech Grains. (Aplicação Prática do Guia de Amostragem para Detecção de Grãos em Biotecnologia).
 - <http://www.archive.gipsa.usda.gov/biotech/samplingplan1.xls> - Este website fornece um modelo de planilha de fácil uso (Arquivo Excel 29K). A planilha permite o lançamento de diferentes possibilidades de tamanho e número de amostras, nível de qualidade aceitável e determinação da probabilidade de aceitação de lotes de grãos à um dado nível de concentração. É possível também gerar as probabilidades em forma de gráficos para facilitar a interpretação. Dados específicos podem ser salvos para documentação e futuras análises.
2. A referência a seguir é de grande ajuda na elaboração de um plano de amostragem: Remund, K.M., Dixon, D.A., Wright D.L., Holden, L.R. “Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits”, Seed Science Research, June 2001, Vol.



Tamanhos de amostras



Método Comum de Extração

Gramas de milho x 1,5 = mL de água

Por exemplo: (200 x 0,25) = 50g x 1,5 = 75mL de água

11 No.2, pp. 101-119 (Considerações estatísticas em testes de pureza de sementes para eventos transgênicos).

- Para selecionar o tamanho apropriado de amostra, determinar a pureza padrão e o grau de confiança requerido. O grau de confiança significa a probabilidade estatística de que a concentração real de Cry1F no lote de grãos esteja abaixo da pureza padrão requerida. A Tabela 1 fornece instruções para a determinação do número de sub-amostras necessárias a fim de obter uma detecção efetiva para diferentes concentrações de OGM com grau de confiança de 95% e 99%.

Tabela 1 – Milho - Quantidade necessária de sub-amostras de 200 grãos

Grau de Confiança (%)	Nível de Concentração de Cry1F			
	5%	1%	0.5%	0.25%
95%	1	2	3	6
99%	2	3	5	9

Nota: Detecção de Cry1F em níveis de concentração de 0.5% , com 95% de grau de confiança poderá demandar teste de 03 sub-amostras de 200 grãos com as 3 sub-amostras negativas.

No caso de diferentes níveis de detecção ou de grau de confiança, consultar a planilha Excel do USDA/GIPSA citada no Passo nº 1 acima ou ligar para o Suporte Técnico da EnviroLogix descrito na última página deste manual.

Passo 2: Determinar o Peso da Sub-amostra, Tamanho da Jarra e Tempo de Trituração

- Determinar o peso médio do grão do lote a ser testado (pesar 100 grãos e dividir o valor do peso por 100).
- Calcular o peso do número dos grãos a serem testados (número de grãos X peso médio do grão). A tabela 2 abaixo, fornece instruções sobre o tamanho da jarra e o tempo necessário de trituração de acordo com o peso da amostra.

Tabela 2

Cultura	Peso da amostra (g)	Tamanho da Jarra (oz.)	Tempo de Trituração (seg.)
Milho	10-25	4	30
	25-65	8	30
	65-250	32	45

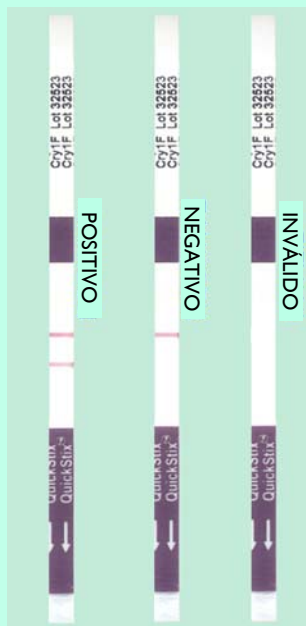
- Escolher um tamanho de jarra apropriado para sua amostra de acordo com a Tabela 2 acima.
- Calcular o volume necessário de água para a preparação da amostra seguindo a proporção de 1,5:1 (Método Comum de Extração, à esquerda).

Passo 3: Preparo da Amostra

- Pesar a amostra de acordo com as instruções do passo 2 e colocá-la dentro da jarra apropriada.
- Cobrir a jarra com a tampa protetora.



Evitar extrair partículas junto com o líquido



Qualquer linha rosa visível no lugar da Linha de Teste é considerado um resultado positivo

3. Triturar a amostra na velocidade máxima de acordo com o tempo especificado na tabela 2 ou até que todos os grãos inteiros sejam quebrados.
4. Adicionar o volume de água de torneira indicado pela fórmula Método Comum de Extração da página anterior. Por exemplo: para testar 200 grãos com peso médio de 0,25g ($200 \times 0,25$) = $50g \times 1,5$ = 75 mL de água.
5. Tampar e agitar vigorosamente a jarra até que toda a amostra esteja molhada (pelo menos 30 segundos, dependendo do número de grãos). A amostra começará a sedimentar-se de imediato e o líquido poderá ser extraído neste momento.
6. Extrair 0.5 ml de líquido da camada superior do sobrenadante enchendo a parte estreita da pipeta de transferência (veja a figura à esquerda desta página), evitando extrair partículas do sedimento. Dispensar o líquido dentro do tudo de reação.
7. Para prevenir contaminação cruzada limpar minuciosamente o triturador e a jarra antes de preparar a próxima amostra. Usar uma pipeta nova e um tubo de reação novo para cada amostra.

Como Realizar o Teste Tiras QuickStix

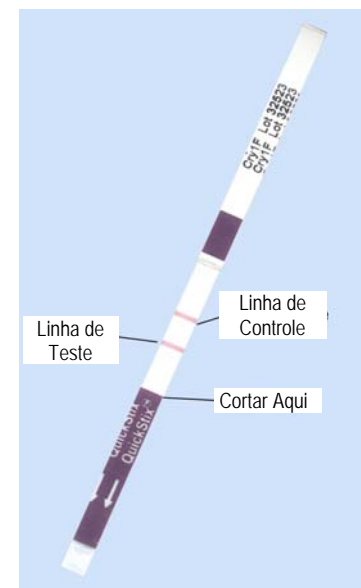
1. Aguardar que o tubo com as tiras alcance a temperatura ambiente antes de destampá-lo. Remover as tiras do QuickStix que serão utilizadas. Evitar dobrar as tiras. Após o uso tampar o tubo imediatamente.
2. Colocar a tira dentro do tubo de reação. A amostra deverá fluir na tira. Utilizar um suporte para tubos, se necessário.
3. Aguardar 5 minutos de reação para iniciar a interpretação do resultado da tira. Resultados de amostras positivas poderão ser observados mais rapidamente.
4. Para arquivar a tira, cortar e descartar a extremidade inferior da tira correspondente à fita com setas impressas.

Interpretando os Resultados

O desenvolvimento da Linha de Controle dentro de 5 minutos indica o correto funcionamento da tira. Caso a tira não desenvolva a Linha de Controle a mesma deverá ser descartada e deverá ser utilizada uma nova tira.

Se a amostra conter pelo menos 0.5% de milho modificado Cry1F, uma segunda linha (Linha de Teste) deverá ser desenvolvida na região entre a Linha de Controle e a extremidade inferior da tira. O resultado deverá ser interpretado como positivo para a expressão da proteína Cry1F.

Se a amostra for negativa, a tira mostrará somente a Linha de Controle.



Armazenamento do Kit

O Kit QuickStix pode ser armazenado à temperatura ambiente ou refrigerado por um longo período. Observar a vida útil descrita na caixa do kit para cada temperatura de armazenamento e seguir corretamente. Este kit pode ser usado para testes no campo; porém, sua exposição prolongada à temperaturas elevadas pode afetar adversamente os resultados dos testes. Abrir o tubo somente no momento do uso das tiras.

Precauções e Notas



- Este kit foi desenvolvido para diagnosticar somente a presença ou ausência da proteína transgênica, portanto, não é um teste quantitativo.
- Este produto não pode ser aplicado para nenhum outro tipo de cultura bem como para testar folhas ou sementes individuais.
- Como todos os testes, é recomendado, quando necessário, que os resultados sejam confirmados por métodos alternativos.
- O teste foi otimizado para ser usado com o protocolo fornecido neste kit. Desvios deste protocolo podem invalidar os resultados deste teste.
- Os resultados gerados através do uso correto deste kit refletem a condição da amostra de trabalho diretamente testada. Extrapolações dessa condição aos respectivos lotes originais devem ser baseadas em procedimentos confiáveis de amostragem e cálculos estatísticos, os quais indicam os efeitos randômicos e não randômicos de amostragem de lotes de sementes e incerteza do ensaio. Um resultado negativo da amostra de trabalho obtido em testes corretamente realizados não significa, necessariamente, que o lote original é inteiramente negativo para a análise ou proteína em questão.
- Atenção: um forte resultado positivo de uma amostra pode, seguramente, ser interpretado em 2 minutos de reação do teste. Porém, não é seguro concluir que uma amostra é negativa ou fracamente positiva, antes que os 5 minutos de reação tenham transcorridos.
- **NÃO** deixar os kits expostos ao sol ou no interior de veículos. Proteger todos os componentes do kit de temperaturas extremas, altas ou baixas, quando fora de uso.
- O kit não deverá ser utilizado após a data de vencimento.
- Evitar dobrar as tiras.
- **Tomar extremo cuidado para evitar contaminação cruzada entre as amostras, líquidos ou materiais descartáveis.**



**Para Suporte
Técnico
Contactar:**

**Envirologix do Brasil
Diagnósticos Ltda.
Rua Francisco Otaviano
n°60
Sala 92
Jd. Chapadão,
Campinas/SP
CEP 13.070-056, Brasil**

**Tel +55 (19) 3307-8887
Fax +55 (19) 3307-8889**

**cinthia.silva@
envirologix.com**

**Página na web:
www.envirologix.com**



GARANTIA LIMITADA

EnviroLogix Inc. (“EnviroLogix”) garante os produtos vendidos nos termos deste instrumento (“os Produtos”) contra defeitos nos materiais e na fabricação quando usados de acordo com as instruções a ele aplicáveis por período não superior ao prazo de validade impresso na embalagem. Se o Produto não estiver em conformidade com a Garantia Limitada e o cliente notificar a EnviroLogix por escrito descrevendo os defeitos encontrados dentro do período de garantia, inclusive prontificando-se a devolvê-lo à EnviroLogix para avaliação, a EnviroLogix reparará ou substituirá, a seu critério exclusivo, qualquer produto ou parte do mesmo que comprovadamente apresente defeitos nos materiais ou de fabricação dentro do prazo de garantia.

A ENVIROLOGIX NÃO OFERECE NENHUM OUTRO TIPO DE GARANTIA, NEM EXPRESSA NEM TÁCITA, COMO, POR EXEMPLO, GARANTIA PARA FINS COMERCIAIS OU PARA FINALIDADES ESPECÍFICAS. A garantia ora prestada e os dados, especificações e descrições dos produtos da EnviroLogix encontrados em catálogos publicados e na literatura de produtos da EnviroLogix são as únicas declarações que a EnviroLogix reconhece referentes a seus Produtos e à garantia por ela oferecida. Nenhuma outra declaração ou afirmação, escrita ou verbal, por parte de funcionários, agentes ou representantes da EnviroLogix, salvo se firmada por escrito e assinada por encarregado devidamente autorizado da EnviroLogix Inc., será considerada autorizada nem deverá servir de embasamento para nenhum cliente, nem faz parte do contrato de venda ou da presente garantia.

A EnviroLogix não oferece garantia contra danos ou defeitos sofridos durante o transporte ou o manuseio de seus produtos, nem decorrentes de acidentes ou uso impróprio ou anormal dos Produtos, assim como não oferece garantia contra defeitos em produtos ou componentes que não sejam de sua fabricação. A EnviroLogix repassa ao cliente a garantia por ela recebida (se houver) do fabricante desses produtos ou de componentes fabricados por terceiros. A presente garantia também não se aplica a Produtos que tenham sofrido tentativa de alteração ou modificação que não tenham autorização por escrito fornecida pela EnviroLogix.

ESTA GARANTIA É EXCLUSIVA. A única e exclusiva obrigação da EnviroLogix será de reparar ou trocar os Produtos defeituosos de maneira e no período anteriormente mencionado. Com respeito aos Produtos ou qualquer parte dos mesmos a EnviroLogix não assume e não assumirá nenhuma outra obrigação, agravante, responsabilidade estrita ou qualquer outra base que não esteja nesta Garantia. Em nenhuma circunstância baseada nesta Garantia Limitada, a EnviroLogix se responsabilizará por danos acidentais, especiais ou consequentes.

Esta Garantia Limitada expressa a totalidade das obrigações da EnviroLogix com respeito aos Produtos. Se se determinar que qualquer parte desta Garantia Limitada é inaplicável ou ilegal, o restante da mesma permanecerá em plena vigência.

Herculex é uma marca registrada da Dow Agrosciences LLC

EnviroLogix, o logotipo da EnviroLogix, QuickComb, QuickStix e Commom Extraction são marcas registradas da EnviroLogix Inc.

© EnviroLogix 2010