



Via Sant'Anna 131-135  
61030 Cartoceto PU (IT)  
Telephone +39 (0)721 830605  
FAX +39 (0)721837154  
e-mail: info@diatheva.com  
www.diatheva.com



## Grain Quantitative kit

Versione: **Settembre 2021**

**REF** MBK0062



### 1. USO PREVISTO

Grain Quantitative kit consente la quantificazione di *Triticum aestivum* in *Triticum* spp. mediante Real-Time PCR

### 2. INTRODUZIONE

Il grano duro (*Triticum turgidum*) viene generalmente utilizzato per la produzione di pasta date le sue particolari caratteristiche che lo rendono fondamentale per l'ottenimento di un buon prodotto finito. A causa della possibilità di contaminazioni accidentali durante la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto di grani e di semola, la legislazione italiana ha stabilito un livello massimo di contaminazione pari al 3% di grano tenero (*T. aestivum*) in miscele e prodotti di grano duro.

*Grain quantitative kit* si basa sulla ricerca del DNA, che tra i vari componenti risulta generalmente stabile anche se sottoposto ai processi tecnologici utilizzati nell'industria alimentare. Il DNA può così essere amplificato e rivelato con elevata sensibilità e specificità, costituendo un ottimo marcatore molecolare della presenza di grano tenero nel prodotto analizzato e permettendo una sua esatta quantificazione in rapporto alla quantità di grano appartenente al genere *Triticum*.

### 3. PRINCIPIO DEL SAGGIO

*Grain quantitative kit* permette la rilevazione e la quantificazione relativa di DNA genomico di *T. aestivum* attraverso l'amplificazione di un marcatore comune al genere *Triticum* e di un marcatore caratteristico delle cultivar di *T. aestivum* mediante Real-Time PCR, basata sull'utilizzo di sonde marcate al 5' con un fluoroforo ed al 3' con un quencher (Tabella 1). La quantificazione relativa di *T. aestivum* mediante un gene normalizzante è possibile grazie all'amplificazione di una curva standard per ogni gene.

Il kit fornisce una miscela pronta all'uso. Nel kit è incluso un DNA standard contenente DNA di *Triticum turgidum* ed *aestivum* per la preparazione delle curve di calibrazione. Il materiale fornito consente di allestire fino a 5 esperimenti di quantificazione separati.

Il DNA Standard fornito nel kit deriva da sementi certificate di *Triticum aestivum* e *Triticum durum* (*T. turgidum*).

Il kit include inoltre il 3% DNA solution, una soluzione di DNA pronta all'uso contenete 3±0.9% di *Triticum aestivum*/*Triticum* spp. preparata a partire dalle stesse sementi certificate utilizzate per la preparazione degli standard.

**Tabella 1: Target e rispettivi fluorofori**

Target	Fluoroforo
<i>Triticum aestivum</i>	FAM
<i>Triticum turgidum</i>	VIC/Cal Fluor Orange 560

### 4. CONTENUTO DEL KIT

Il kit fornisce tutti i reagenti necessari per l'analisi (Tabella 2).

**Tabella 2: Contenuto del kit**

Reagente	No vial x Volume	Colore del tappo
<b>Multiplex PCR Master Mix</b>	3 x 750 µl	BLU
<b>ROX Solution</b>	1 x 10 µl	NERO
<b>3% DNA Solution</b>	2 x 30 µl	VIOLA
<b>Negative PCR Control</b>	1 x 100 µl	VERDE
<b>Dilution Buffer</b>	1 x 1000 µl	TRASPARENTE
<b>Standard DNA</b>	5 x 30 µl	ROSSO

## 5. MATERIALE RICHIESTO NON FORNITO NEL KIT

- Guanti monouso
- Kit per l'isolamento del DNA
- Pipette
- Puntali sterili con filtro
- Vortex
- Microcentrifuga da banco
- Strumento di real-time PCR
- Plasticheria compatibile per lo strumento di real-time PCR. Piastre clear e/o strip chiuse con foglietti ottici adesivi e tappi ottici.
- Tubi sterili da 1.5 mL
- Congelatori da laboratorio da -30°C a -10°C

Il kit è stato validato e può essere utilizzato con i seguenti termociclatori:

### Termociclatori

- CFX96, Biorad
- ABI7500, Applied Biosystems
- Rotor gene Q, Qiagen
- Quant Studio 3, Applied Biosystems

## 6. LIMITAZIONI DEL SAGGIO

- I campioni devono essere raccolti, trasportati e conservati utilizzando appropriate procedure e condizioni. La raccolta, il trasferimento, lo stoccaggio e il processamento non corretto dei campioni possono causare risultati errati.
- Contaminazioni durante la raccolta, la manipolazione o la preparazione del campione possono causare risultati non attendibili
- Contaminazioni durante la manipolazione del prodotto possono causare risultati non attendibili

## 7. CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a -20°C, al riparo dalla luce. Le performance del kit non sono compromesse fino a 2-3 scongelamenti. Se i reagenti vengono utilizzati a intermittenza, si consiglia di conservarli in aliquote.

## 8. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Leggere attentamente tutte le Informazioni di Prodotto prima di usare il kit.

L'operatore deve sempre prestare attenzione a:

- Determinare le aree pre e post PCR. Non condividere strumenti o consumabili (pipette, puntali, tubi ecc) tra queste aree;
- Conservare separatamente il materiale positivo da tutti gli altri reagenti e, se possibile, aggiungerlo alla mix di reazione in un'area separata;
- Non usare nessun reagente dopo la data di scadenza indicata nell'etichetta;
- Indossare guanti sterili durante tutte le procedure;
- Scongelare tutti i componenti del kit e proteggerli dalla luce prima di iniziare il saggio. Dopo lo scongelamento, miscelare i componenti e centrifugare brevemente;
- Non sostituire o miscelare i reagenti di differenti lotti, al fine di mantenere buone performances;
- In ogni corsa includere 1 PCR Negative contro e un 3% DNA Solution;
- Cambiare frequentemente i guanti;
- Lavare le superfici del banco di lavoro con ipoclorito di sodio al 5%;
- Utilizzare materiali di laboratorio sterili e monouso e non riutilizzare i tubi e i puntali;
- Conservare i reagenti alla temperatura raccomandata;
- Utilizzare micropipette calibrate
- La qualità della preparazione del campione può influenzare la qualità del test di PCR.

## 9. ISTRUZIONI PER L'USO

### 9.1. SETUP STRUMENTO DI REAL TIME PCR

Prima di preparare la miscela di reazione, programmare lo strumento di real-time PCR con il seguente profilo termico (Tabella 3).

**NOTA BENE: Nello strumento Rotor gene Q NON IMPOSTARE LA GAIN OPTIMIZATION**

Tabella 3: Impostazione profilo termico

Fase	Temperature e tempi	Cicli
Denaturazione iniziale	95°C 3 min	1 X
Denaturazione	95°C 15 sec	40 X**
Annealing Estensione*	62°C 40 sec	

\*La fluorescenza dei diversi fluorofori è rilevata durante la fase di **annealing-estensione** nei canali specificati nella tabella a seguire

\*\* quando si utilizza lo strumento Rotor gene Q impostare **38** cicli di reazione

Tabella 4: Impostazione canali di lettura della fluorescenza

Multiplex	Canali di lettura della fluorescenza	
	FAM (Green Channel)	VIC/ Cal Fluor Orange 560 (Yellow Channel)
Target	Triticum aestivum	Triticum turgidum

- Il volume finale di reazione è **20 µL**
- **Per gli strumenti che lo prevedono, nella rispettiva casella "Quencher" di ogni target, selezionare "NFQ-MGB", es: ABI 7500, QS3**
- **Per gli strumenti che lo prevedono, selezionare "ROX" alla voce "Select the dye to use as passive reference" es. ABI 7500, QS3**
- Per l'impostazione della curva standard, inserire i seguenti valori di ng totali rispettivamente per entrambi i target come riportata nella tabella 5

**Tabella 5: Quantità (ng totali) delle curve standard**

Standard	ng Triticum totale/5 µl	ng Triticum aestivum/5 µl
<b>STD1</b>	828.6	33.9
<b>STD2</b>	414.3	16.9
<b>STD3</b>	207.1	8.4
<b>STD4</b>	103.5	4.2
<b>STD5</b>	51.7	2.1

## 9.2. PREPARAZIONE DNA

Per l'isolamento del DNA utilizzare Grains DNA extraction kit (Diatheva, MBK0064) o Mericon food kit (Qiagen), secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. In alternativa utilizzare qualsiasi altro sistema di estrazione purché in grado di fornire DNA adatto per la successiva applicazione in termini di resa e purezza.

## 9.3. DOSAGGIO DNA

La concentrazione del DNA totale ottenuto nello step precedente dovrà essere determinata mediante spettrofotometro o altro sistema disponibile in laboratorio. Per l'ottenimento di una buona quantificazione si consiglia l'utilizzo di 250 ng di DNA estratto per reazione (questo quantitativo può essere rivalutato in base al kit di estrazione in uso presso il laboratorio). Nel caso in cui la resa di estrazione non rende possibile caricare 250ng totali, è possibile caricare un minimo di 150 ng totali.

## 9.4. PREPARAZIONE CURVA STANDARD

Il kit fornisce lo Standard DNA ed il Dilution Buffer da utilizzare per le diluizioni che consentono di ottenere gli standard da STD1 ad STD5. Per preparare la curva standard:

- 1) Scongela il Dilution Buffer da utilizzare per la preparazione degli standard e disporre 4 tubi da 1.5 ml in serie da STD2 fino al tubo STD5;
- 2) Aliquotare 15 µl di Dilution Buffer nei 4 tubi preparati;
- 3) Scongela, miscelare con vortex e centrifugare brevemente il tubo contenente lo Standard DNA per 10", questo rappresenta lo STD1;
- 4) Pipettare 15 µl del STD1 nella provetta contenente 15 µl di Dilution Buffer nominata STD 2;
- 5) Vortexare 10" e centrifugare brevemente;
- 6) Cambiare puntale e pipettare 15 µl dal tubo STD2 nel tubo STD3;
- 7) Vortexare 10" e centrifugare brevemente;
- 8) Ripetere gli steps 6 e 7 per completare anche la preparazione di STD4 e STD5.

**N.B.** Gli standard una volta diluiti non sono stabili per un lungo periodo, si consiglia di utilizzare solo diluizioni fresche. Diluizioni non fresche possono essere utilizzate solo come standard qualitativi della reazione (controllo positivo).

## 9.5. ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI

Tutti gli esperimenti dovrebbero includere un controllo negativo di PCR (NTC-No Template Control), contenente tutti i reagenti di reazione ad eccezione del template, ciò consente di determinare la presenza di potenziali contaminazioni. E' inoltre raccomandato inserire anche un 3% DNA solution al fine di verificare l'accuratezza della qPCR.

- Scongela i componenti protetti dalla luce.

Il reagente Multiplex PCR Master Mix è generalmente pronto all'uso per tutti gli strumenti di Real-Time PCR fatta eccezione per gli strumenti che richiedono una concentrazione più elevata di ROX (High ROX) quali: ABI Prism® 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne, StepOne Plus.

**Nota bene: SOLO per gli strumenti che richiedono una maggiore concentrazione di ROX, al primo utilizzo della Multiplex PCR Master Mix, è necessario aggiungere il reagente ROX Solution come segue: 2.3 µl di ROX solution ad 1 vial di Multiplex PCR Master Mix contenente 750 µl.**

- Vortexare gentilmente **Multiplex PCR Master Mix** per 10 sec e centrifugare brevemente;
- Per ciascun campione da testare, PCR Negative Control e 3% Standard DNA, aliquotare **15 µL della Mastermix** nei tubi di PCR o nei pozzetti della piastra preparata per l'esperimento;
- Aggiungere **5 µL di PCR Negative Control** nel tubo corrispondente;
- In un'area separata, aggiungere **5 µL di campione di DNA da analizzare, 5 µL in doppio di ogni Standard** preparato come al punto 9.4 e **5 µL di 3% DNA Solution** nei corrispondenti pozzetti nei quali è stata precedentemente aliquotata la Mastermix;
- Sigillare ermeticamente i tubi e caricarli nello strumento di real-time PCR, seguendo le istruzioni del produttore.

**NOTA: Si raccomanda di centrifugare i tubi o la piastra di PCR prima di inserirli nel termociclatore per eliminare le bolle d'aria e raccogliere tutti i reagenti sul fondo di ogni pozzetto. Verificare che il liquido sia sul fondo di ogni pozzetto, altrimenti centrifugare di nuovo a rpm più alti per un tempo più lungo**

## 9.6. ANALISI DEI RISULTATI

L'analisi dei risultati deve essere eseguita con il programma in dotazione secondo le raccomandazioni fornite dalla casa produttrice dello strumento. In alcuni casi è possibile che il programma fornisca automaticamente l'impostazione della baseline, si suggerisce di verificare tale impostazione. Analizzare le curve standard e i campioni in entrambi i canali di acquisizione. Utilizzando gli strumenti CFX96, Rotorgene Q, ABI 7500 e Quant Studio 3 riferirsi rispettivamente alle **appendici A, B, C e D** per il set-up dei parametri di analisi. Una volta settati i parametri per ogni strumento, prima di procedere con l'analisi dei campioni verificare che le curve standard rispettino i seguenti valori:

**Tabella 6: Criteri di validità delle curve standard**

	Canale	Efficienza	R <sup>2</sup>
Curva Standard <i>Triticum aestivum</i>	FAM	85-115%	≥0.98
Curva Standard <i>Triticum spp.</i>	VIC/CF0560	85-115%	≥0.98

- **Negative PCR Control:** non deve essere osservata amplificazione entro il 35 ciclo (strumentazione con blocco peltier) o entro il 33 ciclo con strumento Rotor-gene Q. Nel caso in cui si osservano valori di Ct dell'NTC inferiori a quelli indicati sopra, verificare che il Ct ottenuto sia superiore al valore di intercetta ( $y = intercetta$ ). Se il valore è superiore procedere con l'analisi dei risultati, se il valore è inferiore potrebbe essere presente una contaminazione, pertanto sanificare l'area di lavoro e procedere con un nuovo test. Eventuali segnali di amplificazione dopo i cicli indicati sono segnali dovuti alla formazione di dimeri di primers che non interferiscono con l'analisi.
- **3% DNA Solution:** il quantitativo di *Triticum aestivum* nel campione deve essere pari a  $3 \pm 0.9\%$ .

### Campioni:

- se un campione non si amplifica in nessun canale si conclude che non si rileva DNA del genere *Triticum*.
- se un campione si amplifica in entrambi i canali è possibile quantificare la % di *Triticum aestivum* in *Triticum spp.* In ogni canale le concentrazioni dei campioni vengono estrapolate a partire dalle rette di calibrazione che si ottengono dai valori di Ct ai quali escono gli standard e dalle relative quantità. I valori di ng vengono calcolati automaticamente dal software del termociclatore. La quantificazione relativa del grano tenero mediante un target normalizzante si ottiene effettuando il rapporto tra i ng di *Triticum aestivum* (calcolati nel canale Green) e i ng di *Triticum* totale (calcolati nel canale Yellow) moltiplicato per 100 (Tabella 7).

**Tabella 7: Esempio di calcolo della percentuale di *Triticum aestivum***

CAMPIONE	ng <i>triticum aestivum</i> / ng <i>triticum turgidum</i>	RISULTATO
Semola contenente 1% di grano tenero	$(4.8/459.4) * 100$	1%
Semola contenente 3% di grano tenero	$(2.231/74.578) * 100$	3%

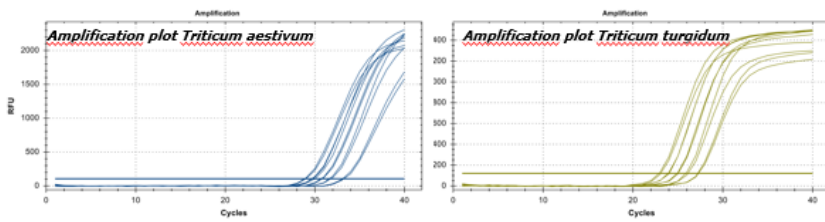
## 9.7. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

OSSERVAZIONE	PROBABILI CAUSE	SOLUZIONE
Nessun segnale di amplificazione da parte del 3% DNA solution, degli Standard e dei campioni	Non è stato programmato correttamente lo strumento	Verificare le impostazioni del protocollo termico e ripetere il test utilizzando le impostazioni corrette
	Conservazione non corretta dei reagenti o utilizzo dei reagenti oltre la data di conservazione	Verificare le condizioni di conservazione e utilizzare un nuovo kit se necessario
Il campione si amplifica con un valore di ct inferiore allo standard 1	Elevata resa di estrazione, campione molto concentrato	Dosare il campione e diluirlo fino ad ottenere una concentrazione pari a 50ng/µL. Ripetere l'amplificazione del campione.
Il campione si amplifica con un valore di ct superiore allo standard 5	Bassa resa di estrazione, campione poco concentrato	Verificare che il campione sia stato ben omogenato e che presenti una granulometria molto fine, ripetere l'estrazione e l'amplificazione

**APPENDICE A - CFX96 Parametri di analisi**

Dal comando setting selezionare "baseline setting" e impostare "baseline subtracted curve fit". Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza (Fig. 1).

Fig 1: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su CFX96

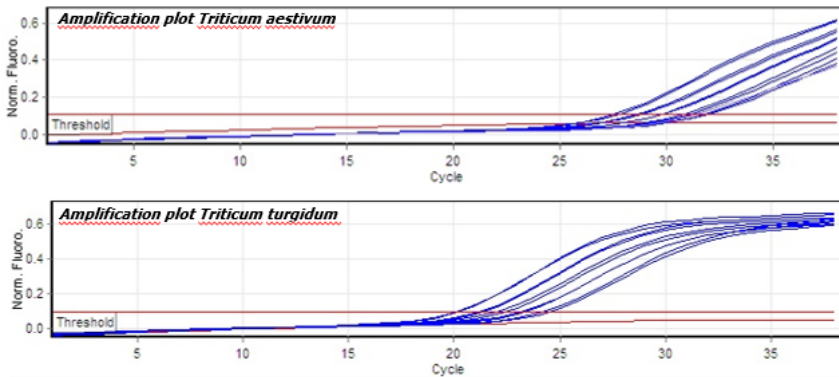


	<u>Triticum aestivum</u>	<u>Triticum turgidum</u>
STD1	28.93	22.98
STD2	29.86	23.97
STD3	30.74	24.96
STD4	31.68	26.00
STD5	33.16	27.24
Efficienza	96.4%	93%
R(2)	0.983	0.994

**APPENDICE B - Rotor gene Q Parametri di analisi**

Per ogni fluoroforo procedere all'analisi come segue: Selezionare la funzione "Dinamic Tube". Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza (Fig. 2).

Fig 2: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su Rotor gene Q

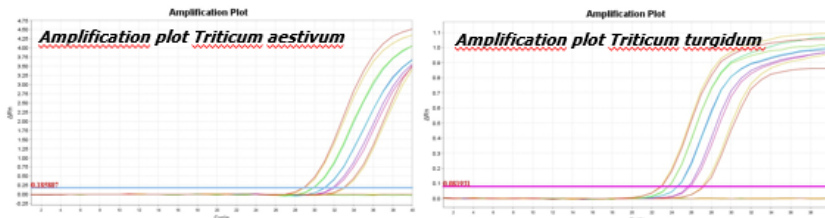


	<u>Triticum aestivum</u>	<u>Triticum turgidum</u>
STD1	27.65	20.17
STD2	28.74	21.25
STD3	29.80	22.23
STD4	31.04	23.24
STD5	31.92	24.39
Efficienza	90%	94%
R(2)	0.994	0.991

**APPENDICE C - ABI 7500 Parametri di analisi**

Per l'analisi, nella schermata "Amplification plot" sezione "Options" deselegionare "Auto" rispettivamente alla threshold e selezionare "Auto Baseline". Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza (Fig. 3).

Fig 3: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su ABI 7500



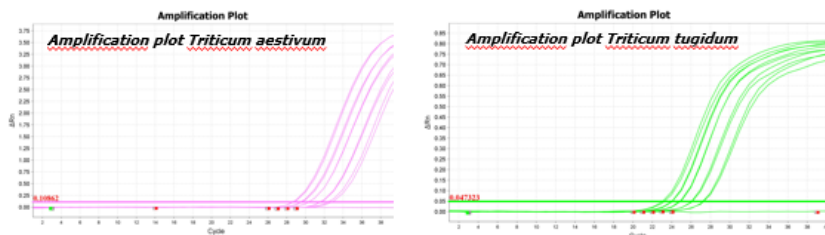
	<u>Triticum aestivum</u>	<u>Triticum turgidum</u>
STD1	28.96	22.72
STD2	29.91	23.49
STD3	31.05	24.41
STD4	31.94	25.58
STD5	33.08	26.97
Efficienza	96.74%	92.45%
R(2)	0.996	0.984

**APPENDICE D – Quant Studio 3 Parametri di analisi**

Per l'analisi, nella schermata "Amplification plot" sezione "Options" deselegionare "Auto" rispettivamente alla threshold e selezionare "Auto Baseline".

Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza (Fig. 4).

Fig 4: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su Quant Studio 3



	<u>Triticum aestivum</u>	<u>Triticum turgidum</u>
STD1	28.72	23.11
STD2	29.58	23.97
STD3	30.39	24.83
STD4	31.65	25.98
STD5	32.64	27.21
Efficienza	101.7%	97.4%
R(2)	0.983	0.994

## APPENDICE E – VALIDAZIONE DEL PRODOTTO

**Specificità:** Il kit amplifica nel canale del VIC/CF0560, specifico per il genere *Triticum* spp., tutti i cereali appartenenti a questo genere mentre non amplifica campioni di cereali appartenenti a generi diversi. Il canale del FAM è selettivo solo per il grano tenero, *Triticum aestivum* (Tabella 8).

**Tabella 8: Specificità**

Cereale	Amplificazione canale VIC ( <i>Triticum</i> spp.)	Amplificazione canale FAM ( <i>Triticum aestivum</i> )
Grano duro ( <i>Triticum turgidum</i> )	✓	-
Grano tenero ( <i>Triticum aestivum</i> )	✓	✓
Kamut ( <i>Triticum turgidum polonicum</i> )	✓	-
Farro ( <i>Triticum turgidum dicoccum</i> )	✓	-
Riso ( <i>Oryza sativa</i> )	-	-
Mais ( <i>Zea mays</i> )	-	-
Miglio ( <i>Panicum millaceum</i> )	-	-
Avena ( <i>Avena sativa</i> )	-	-

**Limite di rilevazione (LOD):** Il valore di LOD del test determinato sia su campioni di DNA che di semole corrisponde allo 0.1% di *Triticum aestivum* in *Triticum turgidum*.

**Limite di quantificazione (LOQ):** Il valore di LOQ del test determinato sia su campioni di DNA che di semole corrisponde 0.2% di *Triticum aestivum* in *Triticum turgidum*.

**Riproducibilità:** La riproducibilità del test valutata su miscele di semole create artificialmente e contenenti 1, 3 e 5% di *Triticum aestivum* in *Triticum turgidum*. Il valore di deviazione standard relativa per tutti i livelli testati è risultato  $\leq 25\%$ .

**Ripetibilità:** La ripetibilità del test valutata su miscele di semole create artificialmente e contenenti 3 e 5% di *Triticum aestivum* in *Triticum turgidum*. Il valore di deviazione standard relativa per tutti i livelli testati è risultato  $\leq 25\%$ .