

CONGEN

SureFood[®] GMO QUANT Roundup Ready Soya

Art. No. S2014

2 x 50 rxn

User Manual



April 2019

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	3
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Quantitative Analyse	5
2.1	Protokoll	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	5
2.1.2	Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen	5
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse	6
3	Weitere Informationen	7
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	7
3.2	Technischer Support	7
3.3	Vertrieb und Bestellung	7

 **Content**

1	General Information	8
1.1	Description	8
1.2	Limit of Detection and Limit of Quantification	8
1.3	DNA-preparation	8
1.4	Kit components and storage	8
1.5	Additionally required equipment and materials	8
1.6	Setup	9
1.7	Detection channel Set-up	9
2	Quantitative Analysis	10
2.1	Protocol	10
2.1.1	Preparation of the master-mix	10
2.1.2	Preparation of the standard DNA dilutions	10
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix	11
2.2	Interpretation of results	11
3	Further Information	12
3.1	Product Information	12
3.2	Technical Support	12
3.3	Distribution and Ordering	12

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Dieser Test dient der relativen quantitativen Bestimmung des Roundup Ready Soja-DNA Anteils (RR Soja). Dafür wird ein PCR-System für den Nachweis von Roundup Ready Soja (OECD Bezeichnung MON-Ø4Ø32-6) und ein Referenz-PCR System für Soja verwendet. Der konstruktsspezifische GMO-Nachweis ist angelehnt an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II/Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q und Applied Biosystems 7500.

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Roundup Ready Soja PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die Bestimmungsgrenze für die gentechnische Veränderung ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Soja-Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für die gentechnische Veränderung bei 0,1 %.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation von Rohmaterialien wird das SureFood® PREP Basic Kit und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Soya Reaction Mix	1 x 1100 µl	Orange
2	RR Soya Reaction Mix	1 x 1100 µl	Gelb
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	Weiß
5	Standard DNA	1 x 50 µl	Dunkelblau
6	Positive Control	1 x 100 µl / 1 % RR Soja	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFood® PREP Basic oder SureFood® PREP Advanced)
- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

SureFood® GMO QUANT Roundup Ready Soya (2 x 50 Reakt.)

Art. Nr. S2014

April 2019

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler/ R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	RR Soja	FAM	+	
	Soja	FAM	+	
Agilent AriaDx	RR Soja	FAM	+	
	Soja	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	RR Soja	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	Soja	FAM	None	
Bio-Rad CFX96	RR Soja	FAM	+	
	Soja	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	RR Soja	green	+	
	Soja	green	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	RR Soja	green	+	
	Soja	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	RR Soja	465-510	+	
	Soja	465-510	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	RR Soja	465-510	+	
	Soja	465-510	+	

2 Quantitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben, Kontrollreaktionen und Standards) ist zu berechnen.

Benötigte Reaktionen für den Soja-Nachweis:

5 Reaktionen für die Standardkurve

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den RR Soja-Nachweis:

5 Reaktionen für die Standardkurve

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren. Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Referenzgen- (**Soja**) und der Nachweisgen- (**RR Soja**) Standardkurven wird die Standard DNA (**Code 5**) in 1:10-Schritten in Dilution Buffer (**Code 4**) verdünnt. Insgesamt werden 5 Verdünnungen benötigt. Es werden 5 Reaktionsgefäße (markiert mit S1 bis S5) vorbereitet und mit je 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) befüllt. Nach folgender Tabelle sind die Verdünnungen herzustellen:

Standard	Verdünnungen	Kopienanzahl je µl	Gesamtkopienanzahl je Reaktion [#]
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 Kopien	500.000 Kopien
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1	10.000 Kopien	50.000 Kopien
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2	1.000 Kopien	5.000 Kopien
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3	100 Kopien	500 Kopien
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S4	10 Kopien	50 Kopien

^{# Hinweis:} Es werden 5 µl DNA im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

2.1.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix.).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control und der Standard-Verdünnungen in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Reaktionsgefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Soja**, **RR Soja**) mit der Analysensoftware der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisgen (**RR Soja**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Referenzgen (**Soja**) wiederholt. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

Aus den berechneten Kopienzahlen für die untersuchte Probe und die Positive Control wird das Verhältnis von GMO-Nachweisgen (**RR Soja**) zum Referenzgen (**Soja**) ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

Probe RR Soja	1.350 Kopien	Positive Control RR Soja	400 Kopien
Probe Soja	45.000 Kopien	Positive Control Soja	28.000 Kopien

Zur Berechnung des prozentualen Anteils ist die Nachweisgen Kopienzahl mit einhundert zu multiplizieren und durch die Referenzgen Kopienzahl zu dividieren.

RR Soja Anteil = **RR Soja** Kopienzahl * 100 / **Soja** Kopienzahl

Proben-DNA **RR Soja** Anteil = $1350 * 100 / 45.000$ Proben-DNA **RR Soja** Anteil = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **RR Soja**-Anteil von 3,0 % und nach derselben Berechnung ein Wert von 1,4 % für die Positive Control.

Zur Berechnung des endgültigen Wertes für die Probe, wird ein Korrekturfaktor (K) eingeführt, der Lauf-zu-Lauf-Schwankungen bereinigt. Dabei wird der im Lauf berechnete Wert für die Positive Control mit dem wahren Wert der Positive Control zu einem Korrekturfaktor K berechnet. Der wahre Wert der Positive Control beträgt 1 % GMO-Anteil. K ist das Verhältnis aus wahren Wert (die Positive Control ist zu 1 % gentechnisch verändert) zu dem in diesem Lauf bestimmten Wert.

$K = \text{wahrer Wert} / \text{bestimmter Wert}$ $K (\text{Beispiel}) = 1 \% / 1,4 \% = 0,7$

Der berechnete Wert der Probe ist das Produkt aus dem in diesem Lauf bestimmten Wert und K.

Wert Probe = bestimmter Wert Probe * K Probe (Beispiel) = $3,0 \% * 0,7 = 2,1 \%$

Somit errechnet sich ein **RR Soja** Anteil von 2,1 % für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Microsoft Excel Berechnungsvorlage und detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsdaten

3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

3.3 Vertrieb und Bestellung

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com



1 General Information

1.1 Description

The test detects the relative quantitative Roundup Ready Soya DNA amount (RR Soya). Therefore the kit contains two PCR systems, one specific for the Roundup Ready Soya (OECD unique identifier MON-04032-6) and the other one specific for Soya (reference system). The construct specific GMO detection is according to the official collection of detection methods of § 64 German food law. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, BioRad CFX96, Roche LightCycler®480 II/ Roche cobas z Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The Roundup Ready Soya PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA-copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA-preparation and DNA-content.

The limit of quantitation depends on the concentration of the sample DNA used in the analysis. For example, if 50,000 target-sequence copies of Soya specific reference gene are present, the relative quantitation limit for Roundup Ready Soya DNA is 0.1 %.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Soya Reaction Mix	1 x 1100 µl	Orange
2	RR-Soya Reaction Mix	1 x 1100 µl	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	White
5	Standard DNA	1 x 50 µl	Dark Blue
6	Positive Control	1 x 100 µl / 1 % RR Soya	Light Blue

Store all reagents at -20°C and protected from light.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFood® PREP Basic or SureFood® PREP Advanced)
- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

SureFood® GMO QUANT Roundup Ready Soya (2 x 50 React.)

Art. No. S2014

April 2019

1.6 Setup

	Blockcycler / R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	RR Soya	FAM	+	
	Soya	FAM	+	
Agilent AriaDx	RR Soya	FAM	+	
	Soya	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	RR Soya	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	Soya	FAM	None	
Bio-Rad CFX96	RR Soya	FAM	+	
	Soya	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	RR Soya	green	+	
	Soya	green	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	RR Soya	green	+	
	Soya	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	RR Soya	465-510	+	
	Soya	465-510	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	RR Soya	465-510	+	
	Soya	465-510	+	

2 Quantitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples, control reactions and standards) for the specific PCR assay.

Reactions needed for the soya detection:

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls (1x no-template control, 2x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

Reactions needed for the RR Soya detection:

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls (1x no-template control, 2x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix by vortexing and centrifuge before opening and use. The tube of the Taq Polymerase should be kept at -20°C and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.2 Preparation of the standard DNA dilutions

Dilute the Standard DNA (**Code 5**) in 1:10 steps in Dilution Buffer (**Code 4**) in order to prepare different DNA concentrations for the standard curves of the Soya reference gene and the RR Soya detection gene. Prepare 5 dilutions of the supplied Standard DNA (**Code 5**) with the supplied Dilution Buffer (**Code 4**). Prepare 5 reaction tubes (labeled S1 to S5) and add 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) each. The following procedure is recommended:

Standard	Dilutions	Copy number per µl	Final copy number per reaction*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100,000 copies	500,000 copies
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1	10,000 copies	50,000 copies
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2	1,000 copies	5,000 copies
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	500 copies
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S4	10 copies	50 copies

***Note:** 5 µl of standard DNA are used for each calibration point. The final copy number per reaction is to be entered in the analysis software of the real-time PCR detection system.

2.1.3 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control and the standard dilutions into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

2.2 Interpretation of results

The calculation for both reaction systems (**Soya, RR Soya**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**RR Soya**) and make the evaluation according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. Repeat the same procedure for the reference gene system (**Soya**). The value for the slope of the standard curve has to be between -3.1 and -3.6 and the correlation coefficient $R^2 > 0.98$. In case of different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

By using the calculated copy numbers for **RR Soya** and **Soya** the relative GMO content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

Sample RR Soya	1,350 copies	Positive Control RR Soya	400 copies
Sample Soya	45,000 copies	Positive Control Soya	28,000 copies

Multiply the copy number of the specific system by 100 and divide by the copy number of the reference gene system to obtain the percentage.

RR Soya content = **RR Soya** copy number * 100 / **Soya** copy number

sample DNA **RR Soya** content = $1,350 * 100 / 45,000$ sample DNA **RR Soya** content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **RR Soya** content of 3 % for the sample, and 1.4 % for the Positive Control with the same calculation.

For a final calculation the use of a correction factor K for the correction of run-to-run fluctuations is necessary. The correction factor is the relation of the true percentage value of the Positive Control (1 % GMO content) and the measured GMO percentage of the Positive Control. The factor is calculated in the following way:

$K = \text{true GMO percentage of Positive Control} / \text{measured GMO percentage of Positive Control}$

K (example) = $1 \% / 1.4 \% = 0.7$

The calculated value for the sample is multiplied with K to obtain a corrected value.

GMO percentage sample = measured GMO percentage of sample * K

sample (example) = $3.0 \% * 0.7 = 2.1 \%$

For that example the **RR Soya** content is 2.1 %.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Microsoft Excel template of calculation and detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report

3.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

3.3 Distribution and Ordering

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

