

CONGEN

**SureFood® GMO QUANT
T25 Corn**

Art. No. S2017

2 x 50 rxn

User Manual



December 2018

 Inhalt /  Content

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Allgemeines..... | 4 |
| 1.1 | Beschreibung..... | 4 |
| 1.2 | Nachweisgrenze..... | 4 |
| 1.3 | DNA-Präparation..... | 4 |
| 1.4 | Kit-Inhalt und Lagerung..... | 4 |
| 1.5 | Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien..... | 4 |
| 1.6 | Geräteeinstellungen..... | 5 |
| 2 | Quantitative Analyse..... | 5 |
| 2.1 | Protokoll..... | 5 |
| 2.1.1 | Herstellen des Master-Mix..... | 5 |
| 2.1.2 | Herstellen der Standard DNA Verdünnungen..... | 6 |
| 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 |
| 1 | General Information..... | 8 |
| 1.1 | Description..... | 8 |
| 1.2 | Limit of Detection..... | 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 |
| 2 | Quantitative Analysis..... | 9 |
| 2.1 | Protocol..... | 9 |
| 2.1.1 | Preparation of the master-mix..... | 9 |
| 2.1.2 | Preparation of the master-mix..... | 10 |
| 2.1.3 | Preparation of the standard DNA dilutions..... | 10 |
| 2.1.4 | Preparation of the real-time PCR-mix..... | 10 |
| 2.2 | Interpretation of results..... | 11 |
| 3 | Further Information..... | 12 |

Dezember 2018

| | | |
|-----|---------------------------------|----|
| 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 T25-Mais Anteils. Dafür wird ein PCR-System für den Nachweis von T25-Mais (OECD Bezeichnung ACS-ZMØØ3-2) und ein Referenz-PCR System für Mais verwendet. Der eventspezifische T25-Mais Nachweis ist angelehnt am validierten Verfahren der Europäischen Kommission. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent Aria Dx, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas Z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500 sowie am Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Nachweisgrenze

Die T25 Mais 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 Mais-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 | Corn Reaction Mix | 1 x 1100 µl | Orange |
| 2 | T25 Corn 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 % T25 Corn | Hellblau |

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

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

| | Blockcycler/Bio Molecular Systems MIC | Rotorcycler |
|--|--|---|
| Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE) | 5 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C | 1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C |
| Temperature Transition Rate/ Ramp Rate | Maximum | Maximum |
| Fluorescence Detection Setup | Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: BHQ Passive Reference: none | Rotorgene Q Reporter Dye: FAM (Green) |
| Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download | | |

2 Quantitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

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

Benötigte Reaktionen für den Mais-Nachweis:

- Je Lauf: 5 Reaktionen für die Standardkurve
3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle und 2x Positive Control)
- Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den T25 Mais-Nachweis:

- Je Lauf: 5 Reaktionen für die Standardkurve
3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle und 2x Positive Control)
- Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen 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%) |
|--|---------------------------|---------------------------------------|
| Corn Reaction Mix oder T25 Reaction Mix | 19,9 µl | 218,9 µl |
| Taq Polymerase | 0,1 µl | 1,1 µl |
| Gesamtvolumen | 20 µl | 220,0 µl |

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 Herstellen der Standard DNA Verdünnungen

Für die Erstellung der Referenzgen- (**Mais**) und der Nachweisgen- (**T25 Mais**) 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 | 1000 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:** 5 µl DNA werden im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

Die hergestellten Standard Verdünnungen sind nach der Verwendung bei -20°C bis zum nächsten Gebrauch aufzubewahren. Vor dem erneuten Gebrauch sind die Lösungen vollständig aufzutauen, im Vortex zu durchmischen und vor dem Öffnen zu zentrifugieren.

2.1.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten, Kapillaren).
- 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 PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Mais, T25 Mais**) 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 (**T25 Mais**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das **Mais**-Referenzgen 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 (**T25 Mais**) zum **Mais**-Referenzgen ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

| | | | |
|-----------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| Probe T25 Mais | 1350 Kopien | Positive Control T25 Mais | 400 Kopien |
| Probe Mais | 45.000 Kopien | Positive Control Mais | 28.000 Kopien |

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

Dezember 2018

T25 Mais Anteil = **T25 Mais** Kopienzahl * 100 / **Mais** KopienzahlProben-DNA **T25 Mais** Anteil = 1350 * 100 / 45.000Proben-DNA **T25 Mais** Anteil = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **T25 Mais** -Anteil von 3,0 % und nach der derselben Berechnung ein Wert von 1,4 % für die Positiv 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 = wahrer Wert / bestimmter Wert

K (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 **T25 Mais** Anteil von 2,1 % für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten
- Microsoft Excel Berechnungsvorlage
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)

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 T25-Corn DNA amount. Therefore the kit contains two PCR systems, one specific for the T25-Corn (OECD unique identifier ACS-ZMØØ3-2) and the other one specific for Corn (reference system). The event-specific detection of T25-Corn is according to the validated method of the European Commission. 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 Aria Dx, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas Z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500 and Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Limit of Detection

The T25 corn 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 Corn specific reference gene are present, the relative quantitation limit for T25 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 | Corn Reaction Mix | 1 x 1100 µl | Orange |
| 2 | T25 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 % T25 | Light Blue |

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

1.5 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, capillaries, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

| | Blockcycler/Bio Molecular Systems MIC | Rotorcycler |
|--|--|---|
| Initial Denaturation (HOLD) | 5 min, 95°C | 1 min, 95°C |
| Cycles | 45 | 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 |
| Fluorescence Detection Setup (exemplary) | Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: BHQ Passive Reference: none | Rotorgene Q Reporter Dye: FAM (Green) |
| Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads | | |

2 Quantitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples, controls and standards).

Reactions needed for the corn detection:

For each run: 5 reactions for the standard curve
3 reactions for controls (1x no-template and 2x Positive Control)

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

Reactions needed for the T25 corn detection:

For each run: 5 reactions for the standard curve
3 reactions for controls (1x no-template and 2x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction with 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 for master-mix | Amount per reaction | 10 reactions (with 10% excess) |
|--|----------------------------|---------------------------------------|
| Corn Reaction Mix or T25 Reaction Mix | 19.9 µl | 218.9 µl |
| Taq Polymerase | 0.1 µl | 1.1 µl |
| Total volume | 20 µl | 220.0 µl |

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

2.1.2 Preparation of the master-mix

| Components for 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.

2.1.3 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 Corn reference gene and the T25 Corn detection gene. Prepare 5 dilutions of the supplied Standard DNA with the supplied Dilution Buffer. Prepare 5 reaction tubes (labeled S1 to S5) and add 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) each. The following procedure is recommended:

| standard | dilution | 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 | 1000 copies | 5000 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.

If the diluted DNA standards (S1 to S5) are not immediately used, store them at -20°C. Before use allow the reagents to thaw, mix them on a vortex and centrifuge carefully before opening and use.

2.1.4 Preparation of the real-time PCR-mix

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

2.2 Interpretation of results

The calculation for both reaction systems (**Corn**, **T25 Corn**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**T25 Corn**) and make the evaluation according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. Repeat the same procedure for the **Corn** reference gene system. 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 **T25 Corn** and **Corn** the relative GMO content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

| | | | |
|------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| Sample T25 Corn | 1350 copies | Positive Control T25 Corn | 400 copies |
| Sample Corn | 45,000 copies | Positive Control Corn | 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.

T25 Corn content = **T25 Corn** copy number * 100 / **Corn** copy number

sample DNA **T25 Corn** content = $1350 * 100 / 45,000$ sample DNA **T25 Corn** content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **T25 Corn** content of 3.0 % 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:

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

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

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

$\text{GMO percentage sample} = \text{measured GMO percentage of sample} * K$

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

For that example the **T25 Corn** content is 2.1 %.

December 2018

3 Further Information

3.1 Product Information

- Validation Report
- Microsoft Excel template of calculation
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)

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

