

CONGEN

SureFood® GMO SCREEN CaMV

Art. No. S2027

100 rxn

User Manual



November 2018

 Inhalt /  Content

1.	Allgemeines.....	2
1.1	Beschreibung.....	2
1.2	Nachweisgrenze.....	2
1.3	DNA-Präparation.....	2
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung.....	2
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien.....	2
1.6	Geräteeinstellungen.....	3
2	Qualitative Analyse.....	3
2.1	Protokoll.....	3
2.1.1	Herstellen des Master-Mix.....	3
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix.....	4
2.2	Interpretation der Ergebnisse.....	4
3	Weitere Informationen.....	4
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel.....	4
3.2	Technischer Support.....	4
3.3	Vertrieb und Bestellung.....	4
1	General Information.....	5
1.1	Description.....	5
1.2	Limit of Detection.....	5
1.3	DNA-preparation.....	5
1.4	Kit components and storage.....	5
1.5	Additionally required equipment and materials.....	5
1.6	Setup.....	6
2	Qualitative Analysis.....	6
2.1	Protocol.....	6
2.1.1	Preparation of the master-mix.....	6
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix.....	6
2.2	Interpretation of results.....	7
3	Further Information.....	7
3.1	Product Information.....	7
3.2	Technical Support.....	7
3.3	Distribution and Ordering.....	7

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird CaMV DNA (Cauliflower mosaic virus) nachgewiesen. Die Anwesenheit von CaMV DNA zeigt einen Befall mit dem Blumenkohlmosaikvirus an. Wirt des Virus sind *Brassicaceae* Gewächse. Mit Hilfe des viruspezifischen Nachweises SureFood® GMO SCREEN CaMV kann der Nachweis einer gentechnischen Veränderung verifiziert werden. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Applied Biosystems 7500, Agilent Aria Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER etc.) verwendet werden.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO SCREEN CaMV PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.3 DNA-Präparation

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

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	1 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 1100 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 11 µl	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/LightCycler® 480/RIDA®CYCLER	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	LightCycler® Channel: 530 oder F1 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene 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 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle. Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC Kit (Art. Nr. S2126) bzw. des SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV Kit (Art. Nr. S2026) empfohlen.

Desweiteren 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%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

November 2018

2.1.2 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 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 der Ergebnisse wird mit der Analysen-Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im CaMV System zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im CaMV System zeigt und eine mit S2026 oder mit S2126 durchgeführte Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** ist. Sollten die Probe und eine durchgeführte Amplifikationskontrolle **negativ** sein, sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

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 CaMV DNA. The presence of CaMV DNA indicates an infestation with the cauliflower mosaic virus. Host of the CaMV are *Brassicaceae* plants. With the virus specific detection system SureFood® GMO CaMV it is possible to verify the detection of a genetic modification. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Applied Biosystems 7500, Agilent Aria Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER etc.).

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN CaMV 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.

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	Reaction Mix	2 x 1100 μ l	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 μ l	Red
3	Positive Control	1 x 200 μ l	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

	Blockcyler/LightCycler® 480/RIDA®CYCLER	Rotorcyclcr
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	LightCycler® Channel: 530 or F1 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene 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 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control, extraction control and an inhibition control. For the preparation of the inhibition control the use of the SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC kit (Art. No. S2126) or the SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV kit (Art. No. S2026), respectively, is recommended.

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)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20 µl	220 µl

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

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- 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 or capillaries and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries into the PCR instrument and start the run according to the setup.

November 2018

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows an amplification signal in the CaMV system.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the CaMV system and a performed amplification control (inhibition control) with S2026 or S2126 of the sample is **positive**. If the sample DNA and a performed amplification control are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

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

