

**Beschreibung**

Mit diesem Test wird gentechnisch veränderte DNA von DP305423 Soja (OECD Bezeichnung DP-305423-1) nachgewiesen. Der eventspezifische Nachweis ist angelehnt am offiziellen Verfahren der Europäischen Kommission. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.) verwendet werden.

**Nachweisgrenze**

Das SureFood® GMO ID DP305423 Soya Verfahren hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

**DNA-Präparation**

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

**Kit-Inhalt und Lagerung**

2x	Reaction Mix (1,1 ml)	<b>(Code 1)</b>
1x	Taq Polymerase (11 µl)	<b>(Code 2)</b>
1x	Positive Control (200 µl)	<b>(Code 3)</b>

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

**Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien**

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

**Protokoll**

## 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 je Probe. Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) 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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 µl</b>	<b>220,0 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotorcycler</b>
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	<b>LightCycler®</b> Channel: 530 oder F1 Acquisition mode: Single in extension phase  <b>Rotor-Gene Q</b> Reporter Dye: FAM (Green)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

3. Herstellen des 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.

**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 im DP305423-Soja-System (FAM-Kanal) eine Amplifikation zeigt. Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA im DP305423-Soja-System keine Amplifikation zeigt. Bei einem **negativen** Ergebnis einer Probe im DP305423-Soja-System muss die zugehörige Inhibitionskontrolle **positiv** sein. Andernfalls 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.

**Weitere Informationen**

- Validierungsdaten

**Technischer Support**

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

**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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**Description**

The test detects DP305423 Soya (OECD unique identifier DP-305423-1) DNA. The event specific detection is according to the official method of the European Commission. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.).

**Limit of Detection**

The SureFood® GMO ID DP305423 Soya assay has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

**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.

**Kit components and storage**

2x	Reaction Mix (1.1 ml)	<b>(Code 1)</b>
1x	Taq Polymerase (11 µl)	<b>(Code 2)</b>
1x	Positive Control (200 µl)	<b>(Code 3)</b>

Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

**Additionally required equipment and materials**

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

**Protocol**

## 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 inhibition control for each sample. For the preparation of the inhibition control the use of the SureFood® GMO Plant PLUS (Art. No. S2049) 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  $-20^{\circ}\text{C}$  and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

<b>Components for master-mix</b>	<b>Amount per reaction</b>	<b>10 reactions (with 10% excess)</b>
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20.0 µl</b>	<b>220.0 µl</b>

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

2. Setup

	<b>Blockcycler</b>	<b>Rotorcycler</b>
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	<b>LightCycler®</b> Channel: 530 or F1 Acquisition mode: Single in extension phase  <b>Rotor-Gene Q</b> Reporter Dye: FAM (Green)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

3. Preparation of the 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.

**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 amplifications in the DP305423 Soya system (FAM channel). A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the DP305423 Soya system. In case of a **negative** result in the DP305423 Soya system the inhibition control of the sample must be **positive**. Is this not the case 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.

**Product Information**

- Validation Report

**Technical Support**

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

**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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

