

CONGEN

SureFood[®] GMO ID DAS-40278-9 Corn

Art. No. S2140
100 rxn

User Manual



June 2020

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	4
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.6	Geräteeinstellungen	5
1.7	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitative Analyse	6
2.1	Protokoll	6
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	6
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse	7
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	8
1.3	DNA-preparation	9
1.4	Kit components and storage	9
1.5	Additionally required equipment and materials	9
1.6	Setup.....	10
1.7	Detection channel Set-up	10
2	Qualitative Analysis	11
2.1	Protocol	11
2.1.1	Preparation of the master-mix	11
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	11
2.2	Interpretation of results	12
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

SureFood® GMO ID DAS-40278-9 Corn ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der spezifischen gentechnisch modifizierten Mais DNA-Sequenz. Für die Identifizierung wird ein eventspezifisches real-time PCR-System für den Nachweis von DAS-40278-9 Mais (OECD Bezeichnung DAS-40278-9) verwendet.

Der 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 Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO ID DAS-40278-9 Corn real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Bei unbehandelten Maiskörnern entspricht diese Nachweisgrenze ca. 0,01 %.

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

Die SureFood® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052) und für stark prozessierte Proben wird der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053) empfohlen. Für die DNA-Präparation aus Rohstoffen sowie aus prozessierten Lebens- und Futtermitteln mit 2 g Probeneinwaage wird der SureFood® PREP Add On (Art. Nr. S1055) in Verbindung mit dem SureFood® PREP Basic empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit
(z.B. SureFood® PREP Basic Art. Nr. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053 / SureFood® PREP Add On Art. Nr. S1055)
- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LTF MyGo Pro
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 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	DAS-40278-9 Mais	FAM	+	
Agilent AriaDx	DAS-40278-9 Mais	FAM	+	
Bio-Rad CFX96	DAS-40278-9 Mais	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	DAS-40278-9 Mais	green	+	
LTF MyGo Pro	DAS-40278-9 Mais	FAM	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	DAS-40278-9 Mais	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
Roche LightCycler® 480 II	DAS-40278-9 Mais	465-510	+	

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: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Positivkontrolle und eine Inhibitionskontrolle.

Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC Kit (Art. Nr. S2126), des SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV Kit (Art. Nr. S2026) oder des SureFood® GMO Plant 4plex Corn/Soya/Canola+IAC (Art. Nr. S2158) empfohlen.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen DAS-40278-9 Mais -Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

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.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 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 in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- 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 der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

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

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt und die zugehörige externe Inhibitionskontrolle **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

Sollte die Proben-DNA in der externen Inhibitionskontrolle **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-DNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem für DAS-40278-9 Mais mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsdaten auf Anfrage

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich 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 SureFood® GMO ID DAS-40278-9 Corn is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific genetically modified corn DNA sequence. Therefore the kit contains an event specific real-time PCR system for the DAS-40278-9 corn (OECD unique identifier DAS-40278-9).

The specific detection is according to the validated method of the European Commission.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments. The technical validation of instruments was performed on LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO ID DAS-40278-9 Corn real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies.

This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed corn grain.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

The SureFood® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052) and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053) is recommended. SureFood® PREP Add On (Art. No. S1055) is intended to be used for the extraction of DNA from raw materials as well as processed food and feed with sample weight of 2 g. It is used in conjunction with the SureFood® PREP Basic.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at –20°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.

Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit
(e.g. SureFood® PREP Basic Art. No. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053 / SureFood® PREP Add On Art. No. S1055)
- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LTF MyGo Pro
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

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	DAS-40278-9 corn	FAM	+	
Agilent AriaDx	DAS-40278-9 corn	FAM	+	
Bio-Rad CFX96	DAS-40278-9 corn	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	DAS-40278-9 corn	green	+	
LTF MyGo Pro	DAS-40278-9 corn	FAM	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	DAS-40278-9 corn	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
Roche LightCycler® 480 II	DAS-40278-9 corn	465-510	+	

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) for the specific PCR assay as well as for the inhibition control.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, positive control and 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), the SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV kit (Art. No. S2026) or the SureFood® GMO Plant 4plex Corn/Soya/Canola+IAC (Art. Nr. S2158), respectively, is recommended.

Reactions needed for the qualitative DAS-40278-9 corn detection:

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1x 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 and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each 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.
- 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 Positive Control 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 evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification and if the external inhibition control of the sample is **positive** with a shift in Cp-Value ≤ 2 compared to the negative control.

If the sample DNA in the external inhibition control shows **no amplification** or a shift in Cp-value > 2 compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. Alternatively the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific DAS-40278-9 corn PCR assay.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report upon request

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

