

CONGEN

SureFood® GMO QUANT T25 Corn

Art. No. S2017
2 x 50 rxn

User Manual



March 2023

 **Inhalt**

| | | |
|-------|----------------------------------------------------|---|
| 1 | Allgemeines | 3 |
| 1.1 | Beschreibung | 3 |
| 1.2 | Nachweis- und Bestimmungsgrenze | 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 | Quantitative Analyse | 6 |
| 2.1 | Protokoll | 6 |
| 2.1.1 | Herstellen des Master-Mix | 6 |
| 2.1.2 | Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen | 6 |
| 2.1.3 | Herstellen des real-time PCR-Mix | 7 |
| 2.2 | Interpretation der Ergebnisse | 7 |
| 3 | Weitere Informationen | 8 |
| 3.1 | Weitere Dokumente und Hilfsmittel | 8 |
| 3.2 | Technischer Support | 8 |
| 3.3 | Vertrieb und Bestellung | 8 |

 **Content**

| | | |
|-------|------------------------------------------------------|----|
| 1 | General Information | 9 |
| 1.1 | Description | 9 |
| 1.2 | Limit of Detection and Limit of Quantification | 9 |
| 1.3 | DNA-preparation | 10 |
| 1.4 | Kit components and storage | 10 |
| 1.5 | Additionally required equipment and materials | 10 |
| 1.6 | Setup | 11 |
| 1.7 | Detection channel Set-up | 11 |
| 2 | Qualitative Analysis | 11 |
| 2.1 | Protocol | 12 |
| 2.1.1 | Preparation of the master-mix | 12 |
| 2.1.2 | Preparation of the standard DNA dilutions | 12 |
| 2.1.3 | Preparation of the real-time PCR-mix | 13 |
| 2.2 | Interpretation of results | 13 |
| 3 | Further Information | 14 |
| 3.1 | Product Information | 14 |
| 3.2 | Technical Support | 14 |
| 3.3 | Distribution and Ordering | 14 |

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® GMO QUANT T25 Corn ist eine real-time PCR zur relativen quantitativen Bestimmung des T25 Mais-DNA Anteils zum gesamten Mais-DNA Anteil. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis von T25 Mais (OECD Bezeichnung ACS-ZMØØ3-2) und ein real-time PCR-System für den Nachweis von Mais (Referenz) verwendet.

Dieser Test dient der Gehaltsbestimmung von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut.

Der spezifische Nachweis ist angelehnt am validierten Verfahren der Europäischen Kommission.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P und Agilent AriaDx.

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die SureFood® GMO QUANT T25 Corn real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht unbehandelten Maiskörnern von ca. 0,01 %.

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

Die Bestimmungsgrenze für die T25 Mais spezifische PCR ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für T25 Mais bei 0,1 %.

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), SureFast® Mag PREP Food (Art. Nr. F1060) 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 | Corn Reaction Mix | 1 x 1050 µl | Orange |
| 2 | T25 Corn Reaction Mix | 1 x 1050 µl | Gelb |
| 3 | Taq Polymerase | 1 x 80 µl | Dunkelrot |
| 4 | Dilution Buffer | 1 x 1400 µl | Weiß |
| 5 | Standard DNA | 1 x 45 µl | Dunkelblau |
| 6 | Positive Control (1% T25 Mais) | 1 x 95 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 S1053 / SureFood® PREP Add-On Art. Nr. S1055 / SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060)
- 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 |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|
| 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 Detektionskanaleinstellungen

| Real-time PCR device | Detection | Detection channel | Quencher | Note |
|------------------------------------|------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agilent Mx3005P | T25 Mais | FAM | + | |
| | Mais | FAM | + | |
| Agilent AriaDx /Mx | T25 Mais | FAM | + | |
| | Mais | FAM | + | |
| Applied Biosystems 7500 | T25 Mais | FAM | None | Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none. |
| | Mais | FAM | None | |
| Bio-Rad CFX96 | T25 Mais | FAM | + | |
| | Mais | FAM | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | T25 Mais | green | + | |
| | Mais | green | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | T25 Mais | green | + | Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt |
| | Mais | green | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | T25 Mais | 465-510 | + | |
| | Mais | 465-510 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | T25 Mais | 465-510 | + | |
| | Mais | 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 Mais-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 T25 Mais-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.

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 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 | 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 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 wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Mais**, **T25 Mais**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisen (**T25 Mais**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Referenzgen (**Mais**) 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 der Positive Control wird das Verhältnis von Nachweisgen (**T25 Mais**) zum Referenzgen (**Mais**) ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

| | | | |
|-----------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| Probe T25 Mais | 1.350 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 durch die Referenzgen Kopienzahl zu dividieren und mit einhundert zu multiplizieren.

T25 Mais Anteil = **T25 Mais** Kopienzahl * 100 / **Mais** Kopienzahl

Proben-DNA **T25 Mais** Anteil = $1.350 * 100 / 45.000$ Proben-DNA **T25 Mais** Anteil = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **T25 Mais** DNA-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 % **T25 Mais**-Anteil. K ist das Verhältnis aus diesem wahren Wert zu dem in diesem Lauf bestimmten Wert.

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

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

DNA-Anteil Probe = bestimmter **DNA-Anteil 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

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

r-biopharm®



1 General Information

1.1 Description

SureFood® GMO QUANT T25 Corn is a real-time PCR for the detection of the relative T25 corn DNA amount to the total corn DNA content. Therefore, the kit contains two PCR systems, one for detection of a T25 corn specific gene (OECD unique identifier ACS-ZMØØ3-2) and one for the detection of a corn gene (reference gene).

This kit can be used for the quantitative detection of genetically modified organisms (GMOs) in food, feed and seeds.

The specific detection 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 verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P and Agilent AriaDx.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The SureFood® GMO QUANT T25 Corn specific 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 limit of quantitation depends on the concentration of the sample DNA used in the analysis. For example, if 50,000 target-sequence copies of the reference gene are present, the relative quantitation limit for T25 corn DNA is 0.1 %.

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.

SureFood® GMO QUANT T25 Corn

(2 x 50 rxn)

Art. No. S2017

March 2023

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. No. F1060) 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 | Corn Reaction Mix | 1 x 1050 µl | Orange |
| 2 | T25 Corn Reaction Mix | 1 x 1050 µl | Yellow |
| 3 | Taq Polymerase | 1 x 80 µl | Dark Red |
| 4 | Dilution Buffer | 1 x 1400 µl | White |
| 5 | Standard DNA | 1 x 45 µl | Dark Blue |
| 6 | Positive Control (1% T25 Corn) | 1 x 95 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 / SureFast® Mag PREP Food Art. No. F1060)
- 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

SureFood® GMO QUANT T25 Corn

(2 x 50 rxn)

Art. No. S2017

March 2023

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 | T25 corn | FAM | + | |
| | corn | FAM | + | |
| Agilent AriaDx /Mx | T25 corn | FAM | + | |
| | corn | FAM | + | |
| Applied Biosystems 7500 | T25 corn | FAM | None | Check the passive reference option ROX is none. |
| | corn | FAM | None | |
| Bio-Rad CFX96 | T25 corn | FAM | + | |
| | corn | FAM | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | T25 corn | green | + | |
| | corn | green | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | T25 corn | green | + | Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels. |
| | corn | green | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | T25 corn | 465-510 | + | |
| | corn | 465-510 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | T25 corn | 465-510 | + | |
| | corn | 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 corn 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 T25 corn 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.

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 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 reference gene (**corn**) and the detection gene (**T25 corn**). 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 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 (**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 reference gene system (**corn**). 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 **corn** and **T25 corn** the relative T25 corn content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

| | | | |
|------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| Sample T25 corn | 1,350 copies | Positive Control T25 corn | 400 copies |
| Sample corn | 45,000 copies | Positive Control corn | 28,000 copies |

Divide the copy number of the specific system by the copy number of the reference gene system and multiply by 100 to obtain the percentage.

T25 corn DNA content = **T25 corn** copy number * 100 / **corn** copy number

sample **T25 corn** DNA content = $1,350 * 100 / 45,000$ sample **T25 corn** DNA content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **T25 corn** DNA 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 % **T25 corn** content) and the measured percentage of the Positive Control.

$K = \text{true value} / \text{measured value}$

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

The measured DNA content for the sample is multiplied with K to obtain a corrected DNA content.

sample DNA content = measured sample DNA content * K sample (example) = $3.0 \% * 0.7 = 2.1 \%$

For this example the **T25 corn 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)
- Verification 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

r-biopharm®

