

CONGEN

**SureFood® GMO QUANT
MIR162 Corn**

Art. No. S2135

2 x 50 rxn

User Manual



June 2018

 Inhalt /  Content

1.	Allgemeines.....	3
1.1	Beschreibung.....	3
1.2	Nachweisgrenze.....	3
1.3	DNA-Präparation.....	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung.....	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien.....	3
1.6	Geräteeinstellungen.....	4
2	Quantitative Analyse.....	4
2.1	Protokoll.....	4
2.1.1	Herstellen des Master-Mix.....	4
2.1.2	Herstellen der Standard DNA Verdünnungen.....	5
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix.....	5
2.2	Interpretation der Ergebnisse.....	5
3	Weitere Informationen.....	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel.....	6
3.2	Technischer Support.....	6
3.3	Vertrieb und Bestellung.....	6
1	General Information.....	7
1.1	Description.....	7
1.2	Limit of Detection.....	7
1.3	DNA-preparation.....	7
1.4	Kit components and storage.....	7
1.5	Additionally required equipment and materials.....	7
1.6	Setup.....	8
2	Quantitative Analysis.....	8
2.1	Protocol.....	8
2.1.1	Preparation of the master-mix.....	8
2.1.2	Preparation of the master-mix.....	9
2.1.3	Preparation of the standard DNA dilutions.....	9
2.1.4	Preparation of the real-time PCR-mix.....	9
2.2	Interpretation of results.....	10
3	Further Information.....	11

June 2018

3.1	Product Information	11
3.2	Technical Support	11
3.3	Distribution and Ordering	11

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Dieser Test dient der relativen quantitativen Bestimmung des MIR162-Mais DNA Anteils. Dafür wird ein PCR-System für den eventspezifischen Nachweis von MIR162-Mais (OECD Bezeichnung SYN-IR162-4) und ein Referenz-PCR System für Mais verwendet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 2.0, Roche cobas Z 480 Analyzer sowie am Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Nachweisgrenze

Die MIR162-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	MIR162 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 % MIR162 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

	Blockcyler/Bio Molecular Systems MIC	Rotorcyler
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® 2.0 Channel: 530 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 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 MIR162 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-DANN

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 MIR162 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- (**MIR162 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. Die Verdünnungen sind bis zu 2 Monate bei -20°C stabil. 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, MIR162 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 (**MIR162 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 (**MIR162 Mais**) zum **Mais**-Referenzgen ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

Probe MIR162 Mais	1350 Kopien	Positive Control MIR162 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.

June 2018

MIR162 Mais Anteil = MIR162 Mais Kopienzahl * 100 / Mais KopienzahlProben-DNA **MIR162 Mais Anteil** = 1350 * 100 / 45.000 Proben-DNA **MIR162 Mais Anteil** = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **MIR162 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.

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

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

$$\text{Wert Probe} = \text{bestimmter Wert Probe} * K \quad \text{Probe (Beispiel)} = 3,0 \% * 0,7 = 2,1 \%$$

Somit errechnet sich ein **MIR162 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 MIR162-Corn DNA amount. Therefore the kit contains two PCR systems, one event-specific for the MIR162-Corn (OECD unique identifier SYN-IR162-4) and the other one specific for Corn (reference system). 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 AriaDx, Applied Biosystems 7500, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® 2.0, Roche cobas Z 480 Analyzer and Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Limit of Detection

The MIR162 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 MIR162 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 μ l	Orange
2	MIR162 Reaction Mix	1 x 1100 μ l	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 11 μ l	Red
4	Dilution Buffer	1 x 1300 μ l	White
5	Standard DNA	1 x 50 μ l	Dark Blue
6	Positive Control	1 x 100 μ l / 1 % MIR162	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) 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
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: BHQ Passive Reference: none	LightCycler® 2.0 Channel: 530 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 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 MIR162 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 MIR162 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.

June 2018

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 MIR162 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. The dilutions are stable up to two months 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.

June 2018

2.2 Interpretation of results

The calculation for both reaction systems (**Corn**, **MIR162 Corn**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**MIR162 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 **MIR162 Corn** and **Corn** the relative GMO content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

Sample MIR162 Corn	1350 copies	Positive Control MIR162 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.

MIR162 Corn content = **MIR162 Corn** copy number * 100 / **Corn** copy number

sample DNA **MIR162 Corn** content = $1350 * 100 / 45,000$ sample DNA **MIR162 Corn** content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **MIR162 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 **MIR162 Corn** content is 2.1 %.

June 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

