

CONGEN

SureFood® GMO ID 4plex Soya I

Art. No. S2161
100 rxn

User Manual



October 2022

 **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	4
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	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	9
1.3	DNA-preparation	10
1.4	Kit components and storage	10
1.5	Additionally required equipment and materials	10
1.6	Setup	10
1.7	Detection channel Set-up	11
2	Qualitative Analysis	12
2.1	Protocol	12
2.1.1	Preparation of the master-mix	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	12
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 ID 4plex Soya I ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung folgender gentechnisch modifizierter Soja DNA-Sequenzen:

- FAM-Kanal: MON87708 Soja (OECD Bezeichnung MON-87708-9)
- FAM-Kanal: CV127 Soja (OECD Bezeichnung BPS-CV127-9)
- VIC-Kanal: DP305423 Soja (OECD Bezeichnung DP-305423-1)
- ROX-Kanal: MON87701 Soja (OECD Bezeichnung MON87701-2)
- Cy5-Kanal: MON87769 Soja (OECD Bezeichnung MON-87769-7)

Die Nachweise sind angelehnt am validierten Verfahren der Europäischen Kommission.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO ID 4plex Soya I real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht bei unbehandelten Sojabohnen 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.

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen* zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert vor 20 erreicht wird.

* z.B. 99,9 % MON87708 Soja und 0,1 % MON87769 Soja

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	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 11µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

1.5 Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern. 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 / SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- 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) 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	MON87708 Soja, CV127 Soja	FAM	+	
	DP305423 Soja	HEX	+	
	MON87701 Soja	ROX	+	
	MON87769 Soja	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	MON87708 Soja, CV127 Soja	green	+	
	DP305423 Soja	yellow	+	
	MON87701 Soja	orange	+	
	MON87769 Soja	red	+	
Applied Biosystems 7500	MON87708 Soja, CV127 Soja	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	DP305423 Soja	VIC	None	
	MON87701 Soja	ROX	None	
	MON87769 Soja	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx	MON87708 Soja, CV127 Soja	FAM	+	
	DP305423 Soja	VIC/HEX	+	
	MON87701 Soja	ROX	+	
	MON87769 Soja	Cy5	+	
Roche LightCycler® 480 II	MON87708 Soja, CV127 Soja	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	DP305423 Soja	533-580	+	
	MON87701 Soja	533-610	+	
	MON87769 Soja	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	MON87708 Soja, CV127 Soja	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	DP305423 Soja	540-580	+	
	MON87701 Soja	540-610	+	
	MON87769 Soja	610-670	+	

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 pro Probe.

Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) oder des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. Nr. S2126) empfohlen.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen MON87708 -, CV127 -, DP305423 -, MON87701 - und MON87769 Soja -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.

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 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.

Im FAM-Kanal wird der Parameter MON87708 Soja, CV127 Soja, im VIC/HEX -Kanal der Parameter DP305423 Soja, im ROX-Kanal der Parameter MON87701 Soja und im Cy5-Kanal der Parameter MON87769 Soja detektiert (siehe Tabelle).

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal 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 MON87708 Soja, CV127 Soja, DP305423 Soja, MON87701 Soja oder MON87769 Soja mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

FAM-Kanal MON87708, CV127 Soja	Ergebnis im jeweiligen Kanal			Ergebnis Externe Inhibitions- kontrolle	Interpretation
	VIC/HEX-Kanal DP305423 Soja	ROX-Kanal MON87701 Soja	Cy5-Kanal MON87769 Soja		
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	MON87708, CV127 Soja DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	DP305423 Soja DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	MON87701 Soja DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	MON87769 Soja DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ, Ziel -DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

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

r-biopharm®



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® GMO ID 4plex Soya I is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of following specific genetically modified soya DNA sequences.

- FAM-channel: MON87708 Soya (OECD unique identifier MON-87708-9)
- FAM-channel: CV127 Soya (OECD unique identifier BPS-CV127-9)
- VIC-channel: DP305423 Soya (OECD unique identifier DP-305423-1)
- ROX-channel: MON87701 Soya (OECD unique identifier MON87701-2)
- Cy5-channel: MON87769 Soya (OECD unique identifier MON-87769-7)

The detections are according to the validated method of the European Commission.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX, ROX and Cy5 at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO ID 4plex Soya I real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies. This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed soybeans.

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.

Note: Inconsistent mixing ratios* may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (C_p value < 20).

* e.g. 99.9 MON87708 Soya and 0.1 % MON87769 Soya

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	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

1.5 Store all reagents at –20°C and protected from light. 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 with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- 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
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	MON87708 Soya, CV127 Soya	FAM	+	
	DP305423 Soya	HEX	+	
	MON87701 Soya	ROX	+	
	MON87769 Soya	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	MON87708 Soya, CV127 Soya	green	+	
	DP305423 Soya	yellow	+	
	MON87701 Soya	orange	+	
	MON87769 Soya	red	+	
Applied Biosystems 7500	MON87708 Soya, CV127 Soya	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	DP305423 Soya	VIC	None	
	MON87701 Soya	ROX	None	
	MON87769 Soya	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	MON87708 Soya, CV127 Soya	FAM	+	
	DP305423 Soya	VIC/HEX	+	
	MON87701 Soya	ROX	+	
	MON87769 Soya	Cy5	+	
Roche LightCycler® 480 II	MON87708 Soya, CV127 Soya	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	DP305423 Soya	533-580	+	
	MON87701 Soya	533-610	+	
	MON87769 Soya	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	MON87708 Soya, CV127 Soya	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	DP305423 Soya	540-580	+	
	MON87701 Soya	540-610	+	
	MON87769 Soya	610-670	+	

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 an inhibition control per sample.

For the preparation of the inhibition control, it is recommended to use the SureFood® GMO Plant PLUS (Art. No. S2049) or the SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. No. S2126).

Reactions needed for the qualitative MON87708 Soya, CV127 Soya, DP305423 Soya, MON87701 Soya and MON87769 Soya detection:

3 reactions for controls (1x negative 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.

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 of the 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.

2.1.2 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.

MON87708 Soya, CV127 Soya DNA is detected in the FAM-channel, DP305423 Soya DNA is detected in the VIC/HEX -channel, MON87701 Soya DNA is detected in the ROX-channel and MON87769 Soya DNA is detected in the Cy5-channel (see table).

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel 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 MON87708 Soya, CV127 Soya, MON87701 Soya, DP305423 Soya or MON87769 Soya PCR assay.

Result in the respective channel				Result	Interpretation
FAM channel MON87708 Soya, CV127 Soya	VIC/HEX channel DP305423 Soya	ROX channel MON87701 Soya	Cy5 channel MON87769 Soya	external inhibition- control	
positive	negative	negative	negative	positive	MON87708 Soya, CV127 Soya DNA detected
negativ	positive	negative	negative	positive	DP305423 Soya DNA detected
negativ	negative	positive	negative	positive	MON87701 Soya DNA detected
negativ	negative	negative	positive	positive	MON87769 Soya DNA detected
negativ	negative	negative	negative	positive	Negative for target DNA
negativ	negative	negative	negative	negative	invalid

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

