

CONGEN

SureFood[®] GMO ID 4plex Soya II

Art. No. S2162
100 rxn

User Manual



April 2021

 **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	9
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 II ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung spezifischer DNA-Sequenzen folgender gentechnisch veränderter Soja-Pflanzen:

- Roundup Ready Soja (RR-Soja) (OECD Bezeichnung MON-04032-6)
- Roundup Ready 2 Yield Soja (RR2Y-Soja) (OECD Bezeichnung MON-89788-1)
- A2704-12-Soja (OECD Bezeichnung ACS-GM005-3)
- A5547-127-Soja (OECD Bezeichnung ACS-GM006-4)

Die Nachweise sind angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB bzw. an 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 Agilent Mx3005P, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer sowie am Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO ID 4plex Soya II real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht unbehandelten Sojabohnen von ca. 0,01 %.

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

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen (z.B. 99,9 % RR-Soja und 0,1 % A5547-127-Soja) zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Basic und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced empfohlen. Für die DNA-Präparation aus Rohstoffen sowie aus prozessierten Lebens- und Futtermitteln mit 2 g Probeneinwaage wird der SureFood® PREP Add On 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 11 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

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 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)	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 Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	RR-Soja	FAM	+	
	RR2Y-Soja	HEX	+	
	A2704-12-Soja	ROX	+	
	A5547-127-Soja	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	RR-Soja	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	RR2Y-Soja	VIC	None	
	A2704-12-Soja	ROX	None	
	A5547-127-Soja	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	RR-Soja	FAM	+	
	RR2Y-Soja	VIC	+	
	A2704-12-Soja	ROX	+	
	A5547-127-Soja	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	RR-Soja	green	+	
	RR2Y-Soja	yellow	+	
	A2704-12-Soja	orange	+	
	A5547-127-Soja	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	RR-Soja	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	RR2Y-Soja	yellow	+	
	A2704-12-Soja	orange	+	
	A5547-127-Soja	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	RR-Soja	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	RR2Y-Soja	533-580	+	
	A2704-12-Soja	533-610	+	
	A5547-127-Soja	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	RR-Soja	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	RR2Y-Soja	540-580	+	
	A2704-12-Soja	540-610	+	
	A5547-127-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 (Art. Nr. S2049), des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. Nr. S2126) empfohlen.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen RR-Soja-, RR2Y-Soja-, A2704-12-Soja- und A5547-127-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 RR-Soja, im VIC/HEX -Kanal der Parameter RR2Y-Soja, im ROX-Kanal der Parameter A2704-12-Soja und im Cy5-Kanal der Parameter A5547-127-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 RR-Soja, RR2Y-Soja, A2704-12-Soja oder A5547-127-Soja mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis	Interpretation
FAM-Kanal RR-Soja	VIC/HEX-Kanal RR2Y-Soja	ROX-Kanal A2704-12-Soja	Cy5-Kanal A5547-127-Soja	Externe Inhibitions- kontrolle	
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	RR-Soja-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	RR2Y-Soja-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	A2704-12-Soja-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	A5547-127-Soja DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ, keine Ziel - DNA vorhanden
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



1 General Information

1.1 Description

SureFood® GMO ID 4plex Soya II is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific genetically modified soya DNA sequences listed as below:

- Roundup Ready Soya (RR Soya) (OECD unique identifier MON-Ø4Ø32-6)
- Roundup Ready 2 Yield Soya (RR2Y Soya) (OECD unique identifier MON-89788-1)
- A2704-12 Soya (OECD unique identifier ACS-GMØØ5-3)
- A5547-127 Soya (OECD unique identifier ACS-GMØØ6-4)

The detections and differentiation are performed according to the validated method of the European Commission respectively official collection of detection methods of §64 German food law.

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 Agilent Mx3005P, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer and Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Limit of Detection

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

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

Note: In mixed samples, inconsistent mixing ratios (e.g. 99.9 % RR Soya and 0.1 % A5547-127 Soya) may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel.

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. SureFood® PREP Add On 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

Store all reagents at –20°C and protected from light.

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 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	RR-Soya	FAM	+	
	RR2Y-Soya	HEX	+	
	A2704-12-Soya	ROX	+	
	A5547-127-Soya	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	RR-Soya	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	RR2Y-Soya	VIC	None	
	A2704-12-Soya	ROX	None	
	A5547-127-Soya	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	RR-Soya	FAM	+	
	RR2Y-Soya	VIC	+	
	A2704-12-Soya	ROX	+	
	A5547-127-Soya	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	RR-Soya	green	+	
	RR2Y-Soya	yellow	+	
	A2704-12-Soya	orange	+	
	A5547-127-Soya	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	RR-Soya	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	RR2Y-Soya	yellow	+	
	A2704-12-Soya	orange	+	
	A5547-127-Soya	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	RR-Soya	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	RR2Y-Soya	533-580	+	
	A2704-12-Soya	533-610	+	
	A5547-127-Soya	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	RR-Soya	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	RR2Y-Soya	540-580	+	
	A2704-12-Soya	540-610	+	
	A5547-127-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 the use of the SureFood® GMO Plant Plus (Art. Nr. S2049), SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. No. S2126) respectively the is recommended.

Reactions needed for the qualitative RR-Soya, RR2Y-Soya, A2704-12-Soya and A5547-127-Soya 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.

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 or capillaries 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.

RR-Soya DNA is detected in the FAM-channel, RR2Y-Soya DNA is detected in the VIC/HEX -channel, A2704-12-Soya DNA is detected in the ROX-channel and A5547-127-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 RR-Soya, RR2Y-Soya, A2704-12-Soya or A5547-127-Soya PCR assay.

Result in the respective channel				Result external inhibition-control	Interpretation
FAM channel RR-Soya	VIC/HEX channel RR2Y-Soya	ROX channel A2704-12-Soya	Cy5 channel A5547-127-Soya		
positive	negative	negative	negative	positive	RR-Soya DNA detected
negativ	positive	negative	negative	positive	RR2Y-Soya DNA detected
negativ	negative	positive	negative	positive	A2704-12-Soya DNA detected
negativ	negative	negative	positive	positive	A5547-127-Soya DNA detected
negativ	negative	negative	negative	positive	Negative, target DNA is not detected
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

