

**SureFood® GMO ID A2704-12 Soja (100 Reakt.)**

Art. Nr. S2057

Dezember 2016

**Beschreibung**

Mit diesem Test wird A2704-12 Soja-DNA nachgewiesen. Dafür wird ein eventspezifisches real-time PCR-System für den Nachweis von A2704-12 Soja (OECD Bezeichnung ACS-GMØØ5-3) verwendet. Der eventspezifische Nachweis ist angelehnt am offiziellen Verfahren der Europäischen Kommission. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.) verwendet werden.

**Nachweisgrenze**

Die SureFood® GMO ID A2704-12 Soja PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien.

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

**DNA-Präparation**

Für die DNA-Präparation von Rohmaterialien wird das SureFood® PREP Basic und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced empfohlen.

**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  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

**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

**Protokoll**

## 1. Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle. Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. Nr. S2126) bzw. des SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV Kit (Art. Nr. S2026) empfohlen.

Desweiteren 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%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler/LightCycler® 480</b>	<b>Rotorcycler</b>
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	<b>LightCycler®</b> Channel: 530 oder F1 Acquisition mode: Single in extension phase  <b>Rotor-Gene Q</b> Reporter Dye: FAM (Green)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

3. Herstellen des 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 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.

**Interpretation der Ergebnisse**

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen. Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im A2704-12 Soja System zeigt. Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im A2704-12 Soja System zeigt und eine mit S2026 oder mit S2126 durchgeführte Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** ist. Sollten die Probe und eine durchgeführte Amplifikationskontrolle **negativ** sein sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

**Weitere Informationen**

- Validierungsdaten

**Technischer Support**

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

**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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**Description**

The test detects A2704-12 Soya DNA. Therefore the kit contains an event specific real-time PCR system for the A2704-12 Soya (OECD unique identifier ACS-GMØØ5-3). The event specific detection is according to the official method of the European Commission. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.).

**Limit of Detection**

The SureFood® GMO ID A2704-12 Soya assay has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies.

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

**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.

**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  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

**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

**Protocol**

## 1. Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control, extraction control and an 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) or the SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV kit (Art. No. S2026), respectively, is recommended.

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  $-20^{\circ}\text{C}$  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)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2. Setup

	<b>Blockcycler/LightCycler® 480</b>	<b>Rotorcycler</b>
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	<b>LightCycler®</b> Channel: 530 or F1 Acquisition mode: Single in extension phase  <b>Rotor-Gene Q</b> Reporter Dye: FAM (Green)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

3. Preparation of the PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- 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 or capillaries and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries into the PCR instrument and start the run according to the setup.

**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 need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows an amplification signal in the A2704-12 Soya system. A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the A2704-12 Soya system and a performed amplification control (inhibition control) with S2026 or S2126 of the sample is **positive**. If the sample DNA and a performed amplification control are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

**Product Information**

- Validation Report

**Technical Support**

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

**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

