

**Beschreibung**

Mit diesem Multiplex-Test werden folgende gentechnisch veränderte Raps-DNA-Sequenzen getrennt nachgewiesen:

- FAM-Kanal: MON88302-Raps (OECD Bezeichnung MON-88302-9)
- ROX-Kanal: DP73496-Raps (OECD Bezeichnung DP-073496-4)
- Cy5-Kanal: RF3-Raps (OECD Bezeichnung ACS-BN003-6)

Die eventspezifischen Nachweise sind angelehnt am offiziellen Verfahren der Europäischen Kommission. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm (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, AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

Nachweisgrenze

Das SureFood® GMO ID 4plex Canola II Verfahren hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Kreuzreaktionen

Das Raps-PCR System ist spezifisch für Kreuzblüten-Gewächse (Brassicaceae), d.h. auch Proben mit Senf werden im Raps-System detektiert.

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°C zu lagern.

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (FAM, VIC/HEX, ROX, Cy5 Kanal)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien)
- 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 je Probe. Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) 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.

* Für die Benutzung des Roche LightCycler® 480 I, II und Cobas ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet 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	20,0 µl	220,0 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler/LightCycler® 480 II* / cobas z 480 Analyzer*
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Nachweissystem MON88302-Raps: Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green cobas z 480 465 nm, 510 nm LC480 II 465 nm, 510 nm Nachweissystem Raps: Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow cobas z 480 540 nm, 580 nm LC480 II 533 nm, 580 nm Nachweissystem DP73496-Raps: Diverse Geräte ROX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Orange cobas z 480 540 nm, 610 nm LC480 II 533 nm, 610 nm Nachweissystem RF3-Raps: Diverse Geräte Cy5-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red cobas z 480 610 nm, 670 nm LC480 II 618 nm, 660 nm
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download	

3. Herstellen des PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten).
- 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.

* Für die Benutzung des Roche LightCycler® 480 I, II und Cobas ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet werden.

Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analysen-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** für den jeweiligen Parameter (MON88302-Raps, DP73496-Raps und RF3-Raps) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt (s. Tabelle). Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Bei einem **negativen** Ergebnis einer Probe muss die zugehörige externe Amplifikationskontrolle **positiv** sein.

FAM-Kanal MON88302- Raps	Ergebnis im jeweiligen Kanal			Externe Amplifikations- kontrolle	Ergebnis
	VIC-Kanal Raps	ROX-Kanal DP73496-Raps	Cy5-Kanal RF3-Raps		
positiv	positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	MON88302-Raps-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	Raps-DNA nachweisbar
negativ	positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	DP73496-Raps-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	positiv/ negativ	RF3-Raps-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar ¹

¹ Sollte eine Probe in allen Kanälen und in der externen 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.

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



Description

The multiplex test detects the following DNA-sequences of genetically modified canola:

- FAM channel: MON88302 canola (OECD unique identifier MON-88302-9)
- ROX channel: DP73496 canola (OECD unique identifier DP-073496-4)
- Cy5 channel: RF3 canola (OECD unique identifier ACS-BN003-6)

The event specific GMO detection methods are according to the official method of the European Commission. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at 510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm (FAM, VIC, 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, AriaDx and Agilent Mx3005P.

Limit of Detection

The SureFood® GMO ID 4plex Canola II assay 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.

Cross reactivity

The canola PCR system is specific for the Brassicacea family. That means samples with mustard are also detected in the canola channel.

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°C and protected from light.

Additionally required equipment and materials

- Real-time PCR instrument with four detection channels (FAM, VIC/HEX, ROX, Cy5 channel)
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils)
- 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 inhibition control for each sample. For the preparation of the inhibition control the use of the SureFood® GMO Plant PLUS (Art. No. S2049) 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°C and not be mixed by vortexing.

* For the use of the Roche LightCycler® 480 I, II and Cobas a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

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
Total volume	20.0 µl	220.0 µl

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

2. Setup

	Blockcycler/LightCycler® 480 II* /cobas z 480 Analyzer
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Detection system MON88302 canola: Diverse devices FAM-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green cobas z 480 465 nm, 510 nm LC480 II 465 nm, 510 nm Detection system canola: Diverse devices VIC/HEX-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow cobas z 480 540 nm, 580 nm LC480 II 533 nm, 580 nm Detection system DP73496 canola: Diverse devices ROX-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Orange cobas z 480 540 nm, 610 nm LC480 II 533 nm, 610 nm Detection system RF3 canola: Diverse devices Cy5-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red cobas z 480 610 nm, 670 nm LC480 II 618 nm, 660 nm
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/unternehmen/download	

3. Preparation of the 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 the Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/wells shortly at low speed.
- Place tubes/wells into the PCR instrument and start the run according to the setup.

* For the use of the Roche LightCycler® 480 I, II and Cobas a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

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** for the respective parameter (MON88302 canola, DP73496 canola, RF3 canola), if the sample DNA shows amplifications in the respective channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel. In case of **negative** results the inhibition control of the sample must be **positive**. Is this not the case 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.

FAM channel MON88302 canola	result in the respective channel			external amplification control	result
	VIC channel canola	ROX channel DP73496 canola	Cy5 channel RF3 canola		
positive	positive	negative	negative	positive/ negative	MON88302 canola DNA detected
negative	positive	negative	negative	positive/ negative	canola DNA detected
negative	positive	positive	negative	positive/ negative	DP73496 canola DNA detected
negative	positive	negative	positive	positive/ negative	RF3 canola DNA detected
negative	negative	negative	negative	negative	invalid ¹

¹ In case of a negative result in all channels and in the external amplification control, the sample contains PCR inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample 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

