

CONGEN

SureFood® GMO ID 4plex Soya III

Art. No. S2164
100 rxn

User Manual



May 2024

 **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	5
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	Grenzen der Methode	8
4	Weitere Informationen	8
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
4.2	Technischer Support	8
4.3	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.....	11
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	Limitations of the method	14
4	Further Information	14
4.1	Product Information	14
4.2	Technical Support	14
4.3	Distribution and Ordering	14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® GMO ID 4plex Soya III ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung folgender gentechnisch modifizierter Soja-DNA-Sequenzen.

- FG72-Soja (OECD Bezeichnung MST-FGØ72-2)
- DAS68416-Soja (OECD Bezeichnung DAS-68416-4)
- GMB151-Soja (OECD Bezeichnung BCS-GM151-6)
- DAS44406-Soja (OECD Bezeichnung DAS-444Ø6-6)

Dieser Test dient dem Screening von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut.

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 Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Bio-Rad CFX96 Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent AriaMx.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO ID 4plex Soya III 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 % GMB151-Soja und 0,1 % FG72-Soja

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052), 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 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –28 bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.

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) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°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 AriaDx /Mx	FG72-Soja	FAM	+	
	DAS68416-Soja	HEX	+	
	GMB151-Soja	ROX	+	
	DAS44406-Soja	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	FG72-Soja	FAM	+	
	DAS68416-Soja	VIC/HEX	+	
	GMB151-Soja	ROX	+	
	DAS44406-Soja	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	FG72-Soja	green	+	
	DAS68416-Soja	yellow	+	
	GMB151-Soja	orange	+	
	DAS44406-Soja	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	FG72-Soja	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	DAS68416-Soja	533-580	+	
	GMB151-Soja	533-610	+	
	DAS44406-Soja	618-660	+	

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 FG72-Soja-, DAS68416-Soja-, GMB151-Soja- oder DAS44406-Soja-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

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.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 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 FG72-Soja, im VIC/HEX -Kanal der Parameter DAS68416-Soja, im ROX-Kanal der Parameter GMB151-Soja und im Cy5-Kanal der Parameter DAS44406-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 FG72-Soja, DAS68416-Soja, GMB151-Soja oder DAS44406-Soja mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis Externe Inhibitions- kontrolle	Interpretation
FAM-Kanal FG72-Soja	VIC/HEX-Kanal DAS68416-Soja	ROX-Kanal GMB151-Soja	Cy5-Kanal DAS44406-Soja		
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	FG72-Soja-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	DAS68416-Soja-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	GMB151-Soja-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	DAS44406-Soja-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ, FG72-Soja-, DAS68416-Soja-, GMB151-Soja-, DAS44406-Soja-DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsreport auf Anfrage

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

4.3 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 III is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of following specific genetically modified soya DNA sequences.

- FG72 soya (OECD unique identifier MST-FG072-2)
- DAS68416 soya (OECD unique identifier DAS-68416-4)
- GMB151 soya (OECD unique identifier BCS-GM151-6)
- DAS44406 soya (OECD unique identifier DAS-44406-6)

This kit can be used for the screening of genetically modified organisms (GMOs) in food, feed and seeds.

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 verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Bio-Rad CFX96 Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent AriaMx.

1.2 Limit of Detection

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

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 (Cp value < 20).

* e.g. 99.9 GMB151 soya and 0.1 % FG72 soya

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052), 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 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at –28 bis -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.

Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.

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 AriaDx /Mx	FG72 soya	FAM	+	
	DAS68416 soya	HEX	+	
	GMB151 soya	ROX	+	
	DAS44406 soya	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	FG72 soya	FAM	+	
	DAS68416 soya	VIC/HEX	+	
	GMB151 soya	ROX	+	
	DAS44406 soya	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	FG72 soya	green	+	
	DAS68416 soya	yellow	+	
	GMB151 soya	orange	+	
	DAS44406 soya	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	FG72 soya	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	DAS68416 soya	533-580	+	
	GMB151 soya	533-610	+	
	DAS44406 soya	618-660	+	

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. 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 FG72 soya, DAS68416 soya, GMB151 soya or DAS44406 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.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 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.

FG72 soya DNA is detected in the FAM-channel, DAS68416 soya DNA is detected in the VIC/HEX -channel, GMB151 soya DNA is detected in the ROX-channel and DAS44406 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 FG72 soya, DAS68416 soya, GMB151 soya or DAS44406 soya PCR assay.

Result in the respective channel				Result	Interpretation
FAM channel FG72 soya	VIC/HEX channel DAS68416 soya	ROX channel GMB151 soya	Cy5 channel DAS44406 soya	external inhibition- control	
positive	negative	negative	negative	positive	FG72 soya DNA detected
negativ	positive	negative	negative	positive	DAS68416 soya DNA detected
negativ	negative	positive	negative	positive	GMB151 soya DNA detected
negativ	negative	negative	positive	positive	DAS44406 soya DNA detected
negativ	negative	negative	negative	positive	Negative for FG72, DAS68416, GMB151 and DAS44406 DNA
negativ	negative	negative	negative	negative	invalid

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report upon request

4.2 Technical Support

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

4.3 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

