

**SureFood® GMO QUANT 35S Corn (2 x 50 Reakt.)**

Art. Nr. S2020

Version 2.1

Beschreibung

Dieser Test dient der relativen quantitativen Abschätzung des 35S CaMV Promotor Anteils in Produkten, die nur Mais enthalten. Dafür wird ein PCR-System für den Nachweis des 35S CaMV Promotors und ein Referenz-PCR System für Mais verwendet. Der 35S CaMV Promotor Nachweis ist angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB. 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. Da verschiedene GMO Mais Events eine unterschiedliche Anzahl an Kopien des 35S Promotors enthalten, können systematische Abweichungen auftreten.

Nachweisgrenze

Die 35S Mais PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die Bestimmungsgrenze für die gentechnische Veränderung ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Mais-Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für die gentechnische Veränderung bei 0,1 %.

DNA-Präparation

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

Kit-Inhalt und Lagerung

1x	Corn Reaction Mix (1,1 ml)	(Code 1)
1x	35S Reaction Mix (1,1 ml)	(Code 2)
1x	Taq Polymerase (11 µl)	(Code 3)
1x	Dilution Buffer (1,3 ml)	(Code 4)
1x	Standard DNA (50 µl)	(Code 5)
1x	Positive Control (100 µl / 1 % Bt11-Mais)	(Code 6)

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°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, Kontrollen und Standards) ist zu berechnen.

Benötigte Reaktionen für den Mais-Nachweis:

Je Lauf: 5 Reaktionen für die Standardkurve
3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle und 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den 35S Nachweis:

Je Lauf: 5 Reaktionen für die Standardkurve
3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle und 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Es 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%)
Corn Reaction Mix oder 35S Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220,0 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler/LightCycler® 480	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
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: TAMRA Passive Reference: none	LightCycler® Channel: 530/610 oder F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: FAM (Green)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

3. Herstellen der Standard DNA Verdünnungen

Für die Erstellung der Referenzgen- (**Mais**) und der Nachweisgen- (**35S**) Standardkurven wird die Standard DNA (**Code 5**) in 1:10 Schritten in Dilution Buffer (**Code 4**) verdünnt. Insgesamt werden 5 Verdünnungen benötigt. Es werden 5 Reaktionsgefäße (markiert mit S1 bis S5) vorbereitet und mit je 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) befüllt. Nach folgender Tabelle sind die Verdünnungen herzustellen:

Standard	Verdünnungen	Kopienanzahl je µl	Gesamtkopienanzahl je Reaktion*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 Kopien	500.000 Kopien
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1	10.000 Kopien	50.000 Kopien
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2	1000 Kopien	5.000 Kopien
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3	100 Kopien	500 Kopien
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S4	10 Kopien	50 Kopien

***Hinweis:** 5 µl DNA werden im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

Die hergestellten Standard Verdünnungen sind nach der Verwendung bei -20°C bis zum nächsten Gebrauch aufzubewahren. Die Verdünnungen sind bis zu 2 Monate bei -20°C stabil. Vor dem erneuten Gebrauch sind die Lösungen vollständig aufzutauen, im Vortex zu durchmischen und vor dem Öffnen zu zentrifugieren.

4. 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 und der Standard Verdünnungen 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 wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Mais, 35S**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisgen (**35S**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Mais-Referenzgen wiederholt. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

Aus den berechneten Kopienzahlen für die untersuchte Probe und der Positive Control wird das Verhältnis von GMO-Nachweisgen (**35S**) zum **Mais**-Referenzgen ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

Probe 35S	1350 Kopien	Positive Control 35S	400 Kopien
Probe Mais	45.000 Kopien	Positive Control Mais	28.000 Kopien

Zur Berechnung des prozentualen Anteils ist die **Nachweisgen** Kopienzahl durch die **Referenzgen** Kopienzahl zu dividieren und mit einhundert zu multiplizieren.

35S Mais Anteil = 35S Kopienzahl * 100 / Mais Kopienzahl

Proben-DNA **35S Mais Anteil** = $1350 * 100 / 45.000$ Proben-DNA **35S Mais Anteil** = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **35S Mais Anteil** von 3,0 % und nach derselben Berechnung ein Wert von 1,4 % für die Positive Control.

Zur Berechnung des endgültigen Wertes für die Probe, wird ein Korrekturfaktor (K) eingeführt, der Lauf-zu-Lauf-Schwankungen bereinigt. Dabei wird der im Lauf berechnete Wert für die Positive Control mit dem wahren Wert der Positive Control zu einem Korrekturfaktor K berechnet. Der wahre Wert der Positive Control beträgt 1 % GMO-Anteil. K ist das Verhältnis aus wahren Wert (die Positive Control ist zu 1 % gentechnisch verändert) zu dem in diesem Lauf bestimmten Wert.

$K = \text{wahrer Wert} / \text{bestimmter Wert}$ $K \text{ (Beispiel)} = 1 \% / 1,4 \% = 0,7$

Der berechnete Wert der Probe ist das Produkt aus dem in diesem Lauf bestimmten Wert und K.

Wert Probe = bestimmter Wert Probe * K Probe (Beispiel) = $3,0 \% * 0,7 = 2,1 \%$

Somit errechnet sich ein **35S Mais Anteil** von 2,1 % für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

Ein 35S positives Ergebnis kann auch auf die Anwesenheit von CaMV DNA (Blumenkohlmosaikvirus, Ursprungsorganismus für den 35S Promotor) zurückzuführen sein (z.B. in Gewürzmischungen, die Brassicaceae enthalten). Mit Hilfe des virusspezifischen Nachweises SureFood® GMO SCREEN CaMV kann der Nachweis einer gentechnischen Veränderung verifiziert werden.

Weitere Informationen

- Validierungsdaten
- Microsoft Excel Berechnungsvorlage
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)

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 test is developed for the relative estimation of the 35S CaMV DNA amount in only Corn containing products. Therefore the kit contains two PCR systems, one specific for the 35S CaMV promoter sequence and the other one specific for Corn (the reference gene). The detection of 35S CaMV promoter is according to German Food Law § 64 LFGB. 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.). Because different GMO Corn events contain a different number of 35S promoter copies systematically deviations may appear.

Limit of Detection

The 35S Corn PCR 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.

The limit of quantitation depends on the concentration of the sample DNA used in the analysis. For example, if 50,000 target-sequence copies of Corn specific reference gene are present, the relative quantitation limit for 35S Corn DNA is 0.1 %.

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

1x	Corn Reaction Mix (1.1 ml)	(Code 1)
1x	35S Reaction Mix (1.1 ml)	(Code 2)
1x	Taq Polymerase (11 µl)	(Code 3)
1x	Dilution Buffer (1.3 ml)	(Code 4)
1x	Standard DNA (50 µl)	(Code 5)
1x	Positive Control (100 µl / 1 % Bt11 Corn)	(Code 6)

Store all reagents at -20°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, controls and standards).

Reactions needed for the Corn detection:

For each run: 5 reactions for the standard curve
3 reactions for controls (1x no-template and 2x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction with each sample DNA

Reactions needed for the 35S detection:

For each run: 5 reactions for the standard curve
3 reactions for controls (1x no-template and 2x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction with 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 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.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Corn Reaction Mix or 35S Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20 µl	220.0 µl

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

2. Setup

	Blockcycler	Rotorcycler
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: TAMRA Passive Reference: none	LightCycler® Channel: 530/610 or F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: FAM (Green)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

3. Preparation of the standard DNA dilutions

Dilute the Standard DNA (**Code 5**) in 1:10 steps in Dilution Buffer (**Code 4**) in order to prepare different DNA concentrations for the standard curves of the Corn reference gene and the 35S detection gene. Prepare 5 dilutions of the supplied Standard DNA with the supplied Dilution Buffer. Prepare 5 reaction tubes (labeled S1 to S5) and add 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) each. The following procedure is recommended:

standard	dilution	copy number per µl	final copy number per reaction*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100,000 copies	500,000 copies
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1	10,000 copies	50,000 copies
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2	1000 copies	5000 copies
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	500 copies
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S4	10 copies	50 copies

***Note:** 5 µl of standard DNA are used for each calibration point. The final copy number per reaction is to be entered in the analysis software of the real-time PCR detection system.

If the diluted DNA standards (S1 to S5) are not immediately used, store them at -20°C. The dilutions should be stable up to two months. Before use allow the reagents to thaw, mix them on a vortex and centrifuge carefully before opening and use.

4. Preparation of the PCR-mix

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

Interpretation of results

The calculation for both reactions (**Corn**, **35S**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**35S**) and make the evaluation according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. Repeat the same procedure for the Corn reference gene system. The value for the slope of the standard curve has to be between -3.1 and -3.6 and the correlation coefficient $R^2 > 0.98$. In case of different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

By using the calculated copy numbers for **35S** and **Corn** the relative GMO content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

sample 35S	1350 copies	Positive Control 35S	400 copies
sample Corn	45,000 copies	Positive Control Corn	28,000 copies

Divide the copy number of specific system by the copy number of the reference gene system and multiply by 100 to obtain the percentage.

35S Corn content = $\frac{\text{35S copy number}}{\text{Corn copy number}} * 100$

sample DNA **35S Corn** content = $\frac{1350}{45,000} * 100 = 3 \%$ sample DNA **35S Corn** content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **35S Corn** content of 3.0 % for the sample and 1.4 % for the Positive Control with the same calculation.

For a final calculation the use of a correction factor K for the correction of run-to-run fluctuations is necessary. The correction factor is the relation from the true percentage value of the Positive Control (1 % GMO content) and the measured GMO percentage of the Positive Control. The factor is calculated in the following way:

$K = \frac{\text{true GMO percentage of Positive Control}}{\text{measured GMO percentage of Positive Control}}$

K (example) = $\frac{1 \%}{1.4 \%} = 0.7$

The calculated value for the sample is multiplied with K to obtain a corrected value.

GMO percentage sample = measured GMO percentage of sample * K

sample (example) = $3.0 \% * 0.7 = 2.1 \%$

For that example the **35S Corn** content is 2.1 %.

Note: A positive 35S signal may result from DNA derived from CaMV (cauliflower mosaic virus, original organism of the 35S promoter) which sometimes is present for example in spices containing Brassicaceae species. With the virus specific detection system SureFood® GMO SCREEN CaMV it is possible to verify the detection of a genetic modification.

Product Information

- Validation Report
- Microsoft Excel template of calculation
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)

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

