

**SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (100 Reakt.)**

Art. Nr. S2126

Dezember 2016

Beschreibung

Dieser Test dient dem Screening nach gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut. Hierfür werden PCR-Systeme für den Nachweis von 35S Promotor DNA des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV), für den Nachweis von *A. tumefaciens* NOS Terminator DNA und für den Nachweis von 34S FMV Promotor DNA verwendet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm (FAM, VIC, ROX und Cy5) detektieren können (z.B. Rotor-Gene Q, Agilent MxSeries, BioRad CFX96, ABI7500, Roche LightCycler® 480¹ etc.), verwendet werden. Der Nachweis ist angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB.

Das Kit enthält zusätzlich eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle, IAC), mit der DNA auf inhibitorische Substanzen, die die PCR unterdrücken, überprüft wird. Im Reaction Mix liegen alle Reagenzien vor, die für die PCR benötigt werden, inklusive einem künstlichen Target (Konzentration: 100 Kopien pro Reaktion). Dieses Target wird amplifiziert und im VIC/HEX-Kanal detektiert. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in einer zugefügten DNA wird die Amplifikation unterdrückt und das Signal gestört.

Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Desweiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrices inhibierend wirken.

Nachweisgrenze

Das SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC Verfahren hat eine Nachweisgrenze von ≤ 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 Kit und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit 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 (522 nm, 553 nm, 610 nm, 670 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

¹ Hinweis: Für Benutzung des Roche LightCycler® 480 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet werden.

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 und eine Extraktionskontrolle. Der Reaction Mix enthält neben dem 35S, NOS und FMV Nachweis auch eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

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
Gesamtvolumen	20,0 µl	220,0 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler / LightCycler® 480	Rotor-Gene Q
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
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Messung 35S: im FAM-Kanal (LC480 I 483 nm, 533 nm; LC480 II 465 nm, 510 nm) Messung NOS: im Cy5-Kanal (LC480 I 615 nm, 670 nm; LC480 II 618 nm, 660 nm) Messung FMV: im ROX-Kanal (LC480 I 483 nm, 610 nm; LC480 II 533 nm, 610 nm) Messung interne Amplifikationskontrolle: im VIC/HEX-Kanal Stratagene - HEX; CFX96 - VIC; (LC480 I 523 nm, 568 nm; LC480 II 533 nm, 580 nm)	Detection: End of extension phase Messung 35S: im FAM-Kanal (Green) Messung NOS: im Cy5-Kanal (Red) Messung FMV: im ROX-Kanal (Orange) Messung interne Amplifikationskontrolle: im VIC-Kanal (Yellow)
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.

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.

35S Promotor DNA wird im FAM-Kanal, NOS Terminator DNA im Cy5-Kanal, FMV Promotor DNA im ROX-Kanal und die interne Amplifikationskontrolle im VIC/HEX-Kanal nachgewiesen.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter (35S/NOS/FMV) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt sowie die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX) **positiv** ist. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (35S/NOS/FMV) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und das zugehörige interne Signal (VIC/HEX) **positiv** ist (siehe dazu untenstehende Tabelle).

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis
FAM Kanal 35S Promotor	Cy5 Kanal NOS Terminator	ROX Kanal FMV Promotor	VIC/HEX Kanal Amplifikations- kontrolle	
positiv	negativ	negativ	positiv	35S Promotor DNA nachweisbar ¹
negativ	positiv	negativ	positiv	NOS Terminator DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	FMV Promotor DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar ²

¹ Der 35S Promoter stammt ursprünglich aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV). Dessen Wirt sind Brassicaceae (Kreuzblütengewächse). Deshalb kann beim 35S Promotor Nachweis auch ein natürlicher Befall mit diesem Virus detektiert werden. Um auszuschließen, dass ein alleiniges 35S Signal vom CaMV stammt, wird der spezifische Nachweis mit dem SureFood® GMO SCREEN CaMV Kit empfohlen.

² Sollte eine Probe in allen Kanälen inklusive dem VIC/HEX-Kanal **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.

In einigen Fällen kann es vorkommen, dass nur eine der beiden DNA´s, die aus einer Untersuchungsprobe extrahiert wurde, 35S und/oder NOS und/oder FMV **positiv** ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Menge an gentechnisch veränderter DNA in der Probe sehr gering ist und an der Nachweisgrenze liegt. Wenn ein solches Ergebnis auch nach mindestens zweimaliger Wiederholung der Analyse vorliegt, wird die Probe als negativ beurteilt.

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

This kit can be used for screening of genetically modified organisms (GMOs) in food, feed and seeds. For this purpose, PCR systems for detection of the 35S Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) promoter DNA sequence, *A. tumefaciens* NOS terminator DNA sequence and for detection of the 34S FMV promoter DNA sequence are applied. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm (FAM, VIC, ROX and Cy5) at the same time (Rotor-Gene Q, Agilent MxSeries, BioRad CFX96, ABI7500, Roche LightCycler® 480² etc.). The kit is according to German Food Law § 64 for the detection of genetically modified DNA sequences.

Additionally the kit contains an internal amplification control (inhibition control, IAC) to examine DNA for inhibiting substances which interfere with the PCR mix. The Reaction Mix contains all reagents necessary for PCR as well as an artificial target (concentration: 100 copies / reaction). The target is amplified during the PCR run and detected in the VIC/HEX-channel. When the DNA contains PCR inhibiting substances, amplification of the target will be suppressed and the signal will be affected.

Some examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). Also spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC 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.

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, equipped with four detection channels (522 nm, 553 nm, 610 nm, 670 nm)
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

² Note: For the use of the Roche LightCycler® 480 instrument a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

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 and extraction control. Beside the 35S/NOS/FMV detection assays the Reaction Mix includes an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

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)
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	Rotor-Gene Q
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
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Detection 35S: in the FAM-Channel (LC480 I 483 nm, 533 nm; LC480 II 465 nm, 510 nm) Detection NOS: in the Cy5-Channel (LC480 I 615 nm, 670 nm; LC480 II 618 nm, 660 nm) Detection FMV: in the ROX-Channel (LC480 I 483 nm, 610 nm; LC480 II 533 nm, 610 nm) Detection internal amplification control: in the VIC/HEX-Channel Stratagene - HEX; CFX96 - VIC) (LC480 I 523 nm, 568 nm; LC480 II 533 nm, 580 nm;)	Detection: End of extension phase Detection 35S: in the FAM-Channel (Green) Detection NOS: in the Cy5-Channel (Red) Detection FMV: in the ROX-Channel (Orange) Detection internal amplification control: in the VIC-Channel (Yellow)
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 PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- 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.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates 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.

The 35S promoter DNA is detected in the FAM-channel, the NOS terminator DNA is detected in the Cy5-channel, the FMV promoter DNA is detected in the ROX-channel and the internal amplification control is detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive** for the respective parameter (35S/NOS/FMV), if the sample DNA shows amplification in the respective channel and the internal signal of the sample shows amplification in the VIC/HEX-channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter (35S/NOS/FMV), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the internal signal (VIC/HEX) of the sample is **positive** (see also table below).

result in the respective channel				
FAM channel 35S promoter	Cy5 channel NOS terminator	ROX channel FMV promoter	VIC/HEX channel amplification control	result
positive	negative	negative	positive	35S promoter DNA detected ¹
negative	positive	negative	positive	NOS terminator DNA detected
negative	negative	positive	positive	FMV promoter DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid ²

¹ The 35S promoter is originally derived from the Cauliflower Mosaic Virus. Brassicaceae species are the host of the CaMV. Therefore, the analysis for the 35S promoter also detects the naturally occurring virus. It is possible that a sample containing the virus yields a positive result, although no GMO is present. As a supplementary kit, CONGEN offers the SureFood® GMO SCREEN CaMV kit, which helps to assure the absence of the natural Cauliflower Mosaic Virus in the sample in case of a single positive 35S result.

² In the case of a negative result in all channels including the VIC/HEX-channel 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.

It may appear in some cases that only one of the two DNAs prepared from a test sample is 35S and/or NOS and/or FMV **positive**. This indicates that the amount of genetically modified DNA is very low and at the limit of detection. If such results are obtained in at least two repetitions of the analysis, the sample is stated negative.

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

