

CONGEN

**SureFood® GMO SCREEN
P35S:BAR Rice**

Art. No. S2022

2 x 50 rxn

User Manual



June 2018

 **Inhalt** /  **Content**

1.	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	3
1.6	Geräteeinstellungen	4
2	Qualitative Analyse	4
2.1	Protokoll	4
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	4
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	5
2.2	Interpretation der Ergebnisse	5
3	Weitere Informationen	5
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	5
3.2	Technischer Support	5
3.3	Vertrieb und Bestellung	5
1	General Information	6
1.1	Description	6
1.2	Limit of Detection	6
1.3	DNA-preparation	6
1.4	Kit components and storage	6
1.5	Additionally required equipment and materials	6
1.6	Setup	7
2	Qualitative Analysis	7
2.1	Protocol	7
2.1.1	Preparation of the master-mix	7
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	7
2.2	Interpretation of results	8
3	Further Information	8
3.1	Product Information	8

June 2018

3.2 Technical Support8

3.3 Distribution and Ordering8

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird das gentechnische Konstrukt P35S:BAR nachgewiesen. Dieses Konstrukt ist im LibertyLink 601 (LL601 - OECD Bezeichnung BCS-OS003-7) und LibertyLink 62 (LL62 - OECD Bezeichnung ACS-OS002-5) Reis integriert, ist aber auch Bestandteil u.a. im StarLink Mais und Bt176 Mais. Der Nachweis des P35S:BAR Konstruktes erfolgt gemäß des validierten Verfahrens der Europäischen Kommission ("Report on the verification of a construct-specific detection method for identification of Rice GM-events containing P35S:BAR using a real-time PCR assay" vom Joint Research Centre, dem Referenzlabor der Europäischen Kommission). Der P35S:BAR Kit enthält zusätzlich ein Referenz-PCR System für Reis. 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.

1.2 Nachweisgrenze

Die P35S:BAR PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht bei unbehandelten Reiskörnern ca. 0,01 %. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.3 DNA-Präparation

Der real-time PCR Kit ist für eine DNA-Präparation mit dem SureFood® PREP Basic und SureFood® PREP Advanced Kit ausgelegt. Durch die Verwendung von SureFood® PREP Advanced Kit Protokoll 1 (Aufarbeitung von 100 mg der homogenen Probe mit 1,3 mL Lysis Buffer) erhöht sich die DNA-Ausbeute. Damit wird die Nachweisgrenze von 0,01 % bei unbehandelten Reiskörnern gewährleistet.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Rice Reaction Mix	1 x 1100 µl	Orange
2	P35S:BAR Reaction Mix	1 x 1100 µl	Gelb
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
4	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

1.5 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

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler / LightCycler® 480	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: BHQ Passive Reference: none	LightCycler® Channel: 530 oder F1 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		

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: Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle je Probe. Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung der SureFood® GMO Plant PLUS Kit (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.

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 µl	220 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

June 2018

2.1.2 Herstellen des real-time 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.

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. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen. Eine Probe wird **positiv** in Bezug auf LL601 / LL62 Reis bewertet, wenn die Proben-DNA sowohl im P35S:BAR-System als auch im Reis-Referenz-System eine Amplifikation zeigt. Falls nur im P35S:BAR-System eine Amplifikation beobachtet wird, dann handelt es sich nicht um LL601 / LL62 Reis sondern um eine gentechnische Veränderung einer anderen Pflanzenart, welche ebenfalls das P35S:BAR Konstrukt enthält. Eine Probe wird als **negativ** in Bezug auf das P35S:BAR Konstrukt bewertet, wenn die Proben-DNA im P35S:BAR-System keine Amplifikation zeigt. Bei einem **negativen** Ergebnis einer Probe im P35S:BAR-System muss die zugehörige Inhibitionskontrolle **positiv** sein. Andernfalls 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. Sind im Reis-Referenz-System keine Amplifikationen zu beobachten, ist entweder keine Reis-DNA in der Probe vorhanden oder aber die DNA-Präparation war nicht erfolgreich.

3 Weitere Informationen**3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel**

- Validierungsdaten

3.2 Technischer Support

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

3.3 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



1 General Information

1.1 Description

The test detects the genetically construct P35S:BAR. The LibertyLink 601 (LL601 - OECD unique identifier BCS-OS003-7) Rice and the LibertyLink 62 (LL62 - OECD unique identifier ACS-OS002-5) Rice contains this genetically construct but it is also present in other GMOs as StarLink Corn and Bt176 Corn. The detection of P35S:BAR is according to the validated method of the European Commission ("Report on the verification of a construct-specific detection method for identification of Rice GM-events containing P35S:BAR using a real-time PCR assay" from the Joint Research Centre, the Community Reference Laboratory). Additionally the kit contains a reference PCR system for the detection of Rice. 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.).

1.2 Limit of Detection

The P35S:BAR PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies. This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed Rice grain. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

1.3 DNA-preparation

The real-time PCR kit can be used in combination with the SureFood® PREP Basic or SureFood® PREP Advanced Kit. The use of SureFood® PREP Advanced kit protocol 1 (preparation of 100 mg of the homogenized sample with 1.3 ml Lysis Buffer) increases the DNA yield. This ensures the required limit of detection of 0.01 % in unprocessed Rice grain.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Rice Reaction Mix	1 x 1100 µl	Orange
2	P35S:BAR Reaction Mix	1 x 1100 µl	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
4	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at -20°C and protected from light.

1.5 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

1.6 Setup

	Blockcycler / LightCycler® 480	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: BHQ Passive Reference: none	LightCycler® Channel: 530 or F1 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		

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). 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.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Rice Reaction Mix or P35S:BAR 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 the 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 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.

June 2018

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 need to give the correct results.

A sample is stated **positive** for LL601 / LL62 Rice, if the sample DNA shows an amplification both in the P35S:BAR system and the Rice reference system. If only the reaction with sample DNA in the P35S:BAR system is **positive** the sample does not contain LL601 / LL62 Rice. This indicates, that the sample includes a genetically modification of another plant species where the P35S:BAR construct is integrated in the genome. A sample is stated **negative** for P35S:BAR, if the sample DNA shows no amplification in the P35S:BAR system. In case of a **negative** result in the P35S:BAR system 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. If the reaction with sample DNA in the Rice reference system is **negative**, then either the sample contains no Rice material or the DNA preparation was not successfully.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Validation Report

3.2 Technical Support

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

3.3 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

