

**SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/NPTII/PAT/CTP2:CP4 EPSPS  
(100 Reakt.)**

Art. Nr. S2127

Dezember 2016

**Beschreibung**

Dieser Test dient dem Screening nach gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut. Mit diesem Multiplex-Test werden folgende DNA-Sequenzen getrennt nachgewiesen:

- Phosphinothricin-Acetyltransferase Gen (BAR) aus *Streptomyces hygroscopicus*
- Antibiotika-Resistenzgen Neomycin-Phosphotransferase (nptII)
- Phosphinothricin-Acetyltransferase Gen (PAT) aus *Streptomyces viridochromogenes*
- der Übergang vom CTP2 Element (Chloroplasten-Transpeptid-Signalsequenz aus *Arabidopsis thaliana*) zum Herbizidtoleranzgen CP4 EPSPS (5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* Stamm CP4)

Das Kit ist angelehnt an die Verfahren in der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB insbesondere der technischen Regel BVL L-00.00-154.

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<sup>1</sup>, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 sowie am Agilent Mx3005P.

**Nachweisgrenze**

Die SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/NPTII/PAT/CTP2:CP4 EPSPS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  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 der SureFood® PREP Basic und für stark prozessierte Proben wird der 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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

<sup>1</sup> Hinweis: Für die 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, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle je Probe. Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC Kits (Art. Nr. S2126) empfohlen.

Desweiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

### 2. Geräteeinstellungen

	<b>Blockcyler/LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95 °C 45 15 sec, 95 °C 30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Messung nptII: im FAM-Kanal (LC480 II Kanal 465-510)  Messung PAT: im VIC/HEX-Kanal (LC480 II Kanal 533-580)  Messung CTP2:CP4 EPSPS: im ROX-Kanal (LC480 II Kanal 533-610)  Messung BAR: im Cy5-Kanal (LC480 II Kanal 618-660)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>	

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 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 (nptII, PAT, CP2:CP4 EPSPS, BAR) 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 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.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis
FAM-Kanal nptII	VIC/HEX-Kanal PAT	ROX-Kanal CTP2:CP4 EPSPS	Cy5-Kanal BAR	
<b>positiv</b>	negativ	negativ	negativ	nptII-DNA nachweisbar
negativ	<b>positiv</b>	negativ	negativ	PAT-DNA nachweisbar
negativ	negativ	<b>positiv</b>	negativ	CTP2:CP4 EPSPS-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b>	BAR-DNA nachweisbar

**Weitere Informationen**

- Validierungsdaten

**Technischer Support**

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



## Description

This kit can be used for screening of genetically modified organisms (GMOs) in food, feed and seeds. The multiplex test detects the following DNA-sequences:

- Phosphinothricin-Acetyltransferase gene (BAR) from *Streptomyces hygroscopicus*
- Antibiotics-resistance gene Neomycin-Phosphotransferase (nptII)
- Phosphinothricin-Acetyltransferase gene (PAT) from *Streptomyces viridochromogenes*
- the transition from CTP2 (Chloroplast-Transpeptide-signal sequence from *Arabidopsis thaliana*) to herbicide tolerance-gene CP4 EPSPS (5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Syntheses gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4)

The kit is according to German Food Law § 64 for the detection of genetically modified DNA sequences especially according to technical specification BVL L-00.00-124.

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<sup>2</sup>, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 Agilent Mx3005P.

## Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/NPTII/PAT/CTP2:CP4 EPSPS real time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.

## Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument with four detection channels (FAM, VIC/HEX, ROX, Cy5 Kanal)
- 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

<sup>2</sup> note: For the use of the Roche LightCycler® 480 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, extraction control and inhibition control for each sample. For the preparation of the inhibition control the use of the SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC kits (Art. No. S2126) 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.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

<b>Components for master-mix</b>	<b>Amount per reaction</b>	<b>10 reactions (with 10% excess)</b>
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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

2. Setup

	<b>Blockcycler/LightCycler® 480 II</b>
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 of nptII: in the FAM-channel (LC480 II channel 465-510)  Detection of PAT: in the VIC/HEX-channel (LC480 II channel 533-580)  Detection of CTP2:CP4 EPSPS: in the ROX-channel (LC480 II channel 533-610)  Detection of BAR: in the Cy5-channel (LC480 II channel 618-660)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>	

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.

**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 (nptII, PAT, CTP2:CP4 EPSPS, BAR), if the sample DNA shows amplifications in the respective channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter (nptII, PAT, CTP2:CP4 EPSPS, BAR), if the sample DNA shows no amplifications in the respective channel.

In case of a **negative** result 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.

results in the respective channel				
FAM channel nptII	VIC/HEX channel PAT	ROX channel CTP2:CP4 EPSPS	Cy5 channel BAR	result
<b>positive</b>	negative	negative	negative	nptII-DNA detected
negative	<b>positive</b>	negative	negative	PAT-DNA detected
negative	negative	<b>positive</b>	negative	CTP2:CP4 EPSPS-DNA detected
negative	negative	negative	<b>positive</b>	BAR-DNA detected

**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

