

CONGEN

**SureFood® GMO SCREEN 4plex
BAR/PAT/CryIAb/IAC/
CTP2:CP4 EPSPS**

Art. No. S2128
100 rxn

User Manual



November 2019

 **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	4
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	Weitere Informationen	8
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
3.2	Technischer Support	8
3.3	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	10
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	Further Information	14
3.1	Product Information	14
3.2	Technical Support	14
3.3	Distribution and Ordering	14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/PAT/CryIAb/IAc/CTP2:CP4 EPSPS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung folgender gentechnisch modifizierter DNA-Sequenzen.

- Phosphinothricin-Acetyltransferase Gen (BAR) aus *Streptomyces hygroscopicus*
- genetisch modifizierte CryIAb-DNA-Sequenzen und CryIAb/Ac-Fusionsgen-Sequenzen (CryIAb/Ac)
- 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)

Die Nachweise sind angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB bzw. an die 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 Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q sowie am R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/PAT/CryIAb/IAc/CTP2:CP4 EPSPS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht anhand der gentechnisch veränderten Organismen MON87751 Soja (CryIAb/IAc), DAS-81419-2 Soja (PAT), NK603 Mais (CTP2:CP4 EPSPS) und Bt176 Mais (BAR) einer Nachweisgrenze von $\leq 0,01$ %.

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.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Basic und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced empfohlen. Für die DNA-Präparation aus Rohstoffen sowie aus prozessierten Lebens- und Futtermitteln mit 2 g Probeneinwaage wird der SureFood® PREP Add On in Verbindung mit dem SureFood® PREP Basic empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°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	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 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	CryIAb/IAc	FAM	+	
	PAT	HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	CryIAb/IAc	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	PAT	VIC	None	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	None	
	BAR	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	CryIAb/IAc	FAM	+	
	PAT	VIC/HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	CryIAb/IAc	green	+	
	PAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	CryIAb/IAc	green	+	
	PAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	CryIAb/IAc	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	PAT	533-580	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	533-610	+	
	BAR	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	CryIAb/IAc	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	PAT	540-580	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	540-610	+	
	BAR	610-670	+	

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), des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. Nr. S2126) bzw. des SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV Kit (Art. Nr. S2026) empfohlen.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen CryIAb/IAc, PAT, CTP2:CP4 EPSPS, BAR-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

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 CryIAb/IAc, im VIC/HEX -Kanal der Parameter PAT, im ROX-Kanal der Parameter CTP2:CP4 EPSPS und im Cy5-Kanal der Parameter BAR 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 CryIAb/IAc, PAT, CTP2:CP4 EPSPS oder BAR mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

FAM-Kanal CryIAb/IAc	Ergebnis im jeweiligen Kanal			Ergebnis Externe Inhibitions- kontrolle	Interpretation
	VIC/HEX-Kanal PAT	ROX-Kanal CTP2:CP4 EPSPS	Cy5-Kanal BAR		
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	CryIAb/IAc-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	PAT-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	CTP2:CP4 EPSPS-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	BAR-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

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

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich 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

r-biopharm®



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/PAT/CryIAb/IAc/CTP2:CP4 EPSPS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of following specific genetically modified DNA - sequences.

- Phosphinothricin-Acetyltransferase gene (BAR) from *Streptomyces hygroscopicus*
- genetically engineered CryIAb-DNA-sequences and CryIAb/Ac-fusion gene sequences
- 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 detections are according to the validated methods of the European Commission or the official collection of detection methods of §64 German food law.

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 validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystems 7500, Qiagen Rotor-Gene Q and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/PAT/CryIAb/IAc/CTP2:CP4 EPSPS real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies. This is equivalent to a limit of detection of ≤ 0.01 % based on the genetically modified organisms MON87751 Soya (CryIAb/IAc), DAS-81419-2 Soya (PAT), NK603 Corn (CTP2:CP4 EPSPS) and Bt176 Corn (BAR).

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.

1.3 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. SureFood® PREP Add On 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 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at –20°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. Nr. S1055)
- real- time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, 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) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 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 Mx3005P	CryIAb/IAc	FAM	+	
	PAT	HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	CryIAb/IAc	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	PAT	VIC	None	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	None	
	BAR	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	CryIAb/IAc	FAM	+	
	PAT	VIC/HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	CryIAb/IAc	green	+	
	PAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	CryIAb/IAc	green	+	
	PAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	CryIAb/IAc	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	PAT	533-580	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	533-610	+	
	BAR	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	CryIAb/IAc	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	PAT	540-580	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	540-610	+	
	BAR	610-670	+	

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 as well as for the inhibition control.

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), the SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. No. S2126) or the SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV (Art. No. S2026).

Reactions needed for the qualitative CryIAb/IAc, PAT, CTP2:CP4 EPSPS and BAR detection:

3 reactions for controls (1x no-template 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 or capillaries 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.

CryIAb/IAc DNA is detected in the FAM-channel, PAT DNA is detected in the VIC/HEX-channel, CTP2:CP4 EPSPS DNA is detected in the ROX-channel and BAR 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 CryIAb/IAc, PAT, CTP2:CP4 EPSPS or BAR PCR assay.

Result in the respective channel				Result	Interpretation
FAM channel CryIAb/IAc	VIC/HEX channel PAT	ROX channel CTP2:CP4 EPSPS	Cy5 channel BAR	external inhibition control	
positive	negative	negative	negative	positive	CryIAb/IAc DNA detected
negativ	positive	negative	negative	positive	PAT DNA detected
negativ	negative	positive	negative	positive	CTP2:CP4 EPSPS DNA detected
negativ	negative	negative	positive	positive	BAR DNA detected
negativ	negative	negative	negative	negative	invalid

3 Further Information

3.1 Product Information

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

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

