

**CONGEN**

# **SureFood® GMO QUANT 35S Corn**

Art. No. S2020  
2 x 50 rxn

## **User Manual**



**June 2025**

 **Inhalt**

|       |                                                    |   |
|-------|----------------------------------------------------|---|
| 1     | Allgemeines .....                                  | 3 |
| 1.1   | Beschreibung .....                                 | 3 |
| 1.2   | Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....              | 3 |
| 1.3   | DNA-Präparation .....                              | 4 |
| 1.4   | Kit-Inhalt und Lagerung .....                      | 4 |
| 1.5   | Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien ..... | 4 |
| 1.6   | Vorsichtsmaßnahmen .....                           | 4 |
| 1.7   | Geräteeinstellungen .....                          | 5 |
| 1.8   | Detektionskanaleinstellungen .....                 | 5 |
| 2     | Quantitative Analyse .....                         | 6 |
| 2.1   | Protokoll .....                                    | 6 |
| 2.1.1 | Herstellen des Master-Mix .....                    | 6 |
| 2.1.2 | Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen .....     | 7 |
| 2.1.3 | Herstellen des real-time PCR-Mix .....             | 7 |
| 2.2   | Interpretation der Ergebnisse .....                | 8 |
| 3     | Grenzen der Methode .....                          | 9 |
| 4     | Weitere Informationen .....                        | 9 |
| 4.1   | Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....            | 9 |
| 4.2   | Technischer Support .....                          | 9 |
| 4.3   | Vertrieb und Bestellung .....                      | 9 |



## **Content**

|       |                                                      |    |
|-------|------------------------------------------------------|----|
| 1     | General Information .....                            | 10 |
| 1.1   | Description .....                                    | 10 |
| 1.2   | Limit of Detection and Limit of Quantification ..... | 10 |
| 1.3   | DNA-preparation .....                                | 11 |
| 1.4   | Kit components and storage .....                     | 11 |
| 1.5   | Additionally required equipment and materials .....  | 11 |
| 1.6   | Precautions for users .....                          | 11 |
| 1.7   | Setup.....                                           | 12 |
| 1.8   | Detection channel Set-up .....                       | 12 |
| 2     | Quantitative Analysis .....                          | 13 |
| 2.1   | Protocol .....                                       | 13 |
| 2.1.1 | Preparation of the master-mix .....                  | 13 |
| 2.1.2 | Preparation of the standard DNA dilutions .....      | 14 |
| 2.1.3 | Preparation of the real-time PCR-mix .....           | 14 |
| 2.2   | Interpretation of results .....                      | 15 |
| 3     | Limitations of the method .....                      | 16 |
| 4     | Further Information .....                            | 16 |
| 4.1   | Product Information .....                            | 16 |
| 4.2   | Technical Support .....                              | 16 |
| 4.3   | Distribution and Ordering .....                      | 16 |

## **1 Allgemeines**

### **1.1 Beschreibung**

SureFood® GMO QUANT 35S Corn ist eine real-time PCR zur relativen quantitativen Bestimmung des 35S CaMV Promotor-DNA Anteils zum gesamten Mais-DNA Anteil. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis von 35S CaMV Promotors und ein real-time PCR-System für den Nachweis von Mais (Referenz) verwendet.

Dieser Test dient der Gehaltsbestimmung von gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut.

Der spezifische Nachweis ist angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96 Dx/Opus, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Roche LightCycler® 480 II.

### **1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die SureFood® GMO QUANT 35S Corn real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien. Das entspricht unbehandelten Maiskörnern von ca. 0,01 %.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die Bestimmungsgrenze für die 35S Corn spezifische PCR ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für 35S Corn bei 0,1 %.

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 der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. Nr. F1060) und für stark prozessierte Proben wird der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053) empfohlen. Für die DNA-Präparation aus Rohstoffen sowie aus prozessierten Lebens- und Futtermitteln mit 2 g Probeneinwaage wird der SureFood® PREP Add On (Art. Nr. S1055) in Verbindung mit dem SureFood® PREP Basic empfohlen.

## 1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

| Kit Code | Reagenz                        | Menge       | Deckelfarbe |
|----------|--------------------------------|-------------|-------------|
| 1        | Corn Reaction Mix              | 1 x 1050 µl | Orange      |
| 2        | 35S Reaction Mix               | 1 x 1050 µl | Gelb        |
| 3        | Taq Polymerase                 | 1 x 80 µl   | Dunkelrot   |
| 4        | Dilution Buffer                | 1 x 1400 µl | Weiß        |
| 5        | Standard DNA                   | 1 x 45 µl   | Dunkelblau  |
| 6        | Positive Control (1% 35S Corn) | 1 x 95 µl   | Hellblau    |

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°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 / SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060)
- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

## 1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

### 1.7 Geräteeinstellungen

|                                        | <b>Blockcycler &amp;<br/>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b> | <b>Rotorcycler</b> |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|
| 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            |

### 1.8 Detektionskanaleinstellungen

| <b>Real-time PCR<br/>Gerät</b>           | <b>Nachweis</b> | <b>Detektions-<br/>kanal</b> | <b>Quencher</b> | <b>Bemerkung</b>                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agilent AriaDx<br/>/Mx</b>            | 35S             | FAM                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Mais            | FAM                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Bio-Rad<br/>CFX96/Dx/Opus</b>         | 35S             | FAM                          | +               | Baseline Einstellungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baseline subtracted curve fit</li> <li>• Apply fluorescence drift correction</li> </ul>                                                           |
|                                          | Mais            | FAM                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>R-Biopharm<br/>RIDA®CYCLER</b>        | 35S             | green                        | +               | <b>Ignore cycles before</b> , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt.<br>Siehe Seite 47 Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse. |
|                                          | Mais            | green                        | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Qiagen Rotor-<br/>Gene Q</b>          | 35S             | green                        | +               | <b>Achtung:</b> Nur 0.1 ml Reaktionsgefäße verwenden.<br>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.                                                                  |
|                                          | Mais            | green                        | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Roche<br/>LightCycler®<br/>480 II</b> | 35S             | 465-510                      | +               | Quantitative Auswertung erfolgt über den Analyse Typ „Fit Points“                                                                                                                                                  |
|                                          | Mais            | 465-510                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |

## **2 Quantitative Analyse**

### **2.1 Protokoll**

#### **2.1.1 Herstellen des Master-Mix**

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben, Kontrollreaktionen und Standards) ist zu berechnen.

##### **Benötigte Reaktionen für den Mais-Nachweis:**

5 Reaktionen für die Standardkurve

3 Reaktionen für Kontrollen\* (1x Negativkontrolle, 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

##### **Benötigte Reaktionen für den 35S-Nachweis:**

5 Reaktionen für die Standardkurve

3 Reaktionen für Kontrollen\* (1x Negativkontrolle, 2x Positive Control)

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:**

| <b>Komponenten des Master-Mix</b> | <b>Menge pro Reaktion</b> | <b>10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)</b> |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| Reaction Mix                      | 19,3 µl                   | 212,3 µl                               |
| Taq Polymerase                    | 0,7 µl                    | 7,7 µl                                 |
| <b>Gesamtvolumen</b>              | <b>20 µl</b>              | <b>220 µl</b>                          |

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

##### **\* Beschreibung der benötigten Reaktionen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – nur PREP Reagenzien
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügten Positive Control

## 2.1.2 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<br>je µl | Gesamtkopienanzahl<br>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   | 1.000 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:** Es werden 5 µl DNA im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

## 2.1.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- 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 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 wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Mais, 35S**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisen (**35S**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Referenzgen (**Mais**) 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 Nachweisgen (**35S**) zum Referenzgen (**Mais**) ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

|                   |               |                              |               |
|-------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| Probe <b>35S</b>  | 1.350 Kopien  | Positive Control <b>35S</b>  | 400 Kopien    |
| Probe <b>Mais</b> | 45.000 Kopien | Positive Control <b>Mais</b> | 28.000 Kopien |

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

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

Proben-DNA **35S** Anteil =  $1.350 * 100 / 45.000$       Proben-DNA **35S** Anteil = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **35S** DNA-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 % **35S**-Anteil. K ist das Verhältnis aus diesem wahren Wert zu dem in diesem Lauf bestimmten Wert.

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

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

$\text{DNA-Anteil Probe} = \text{bestimmter DNA-Anteil Probe} * K$        $\text{Probe (Beispiel)} = 3,0 \% * 0,7 = 2,1 \%$

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

### **3 Grenzen der Methode**

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z.B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.

### **4 Weitere Informationen**

#### **4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel**

- Microsoft Excel Berechnungsvorlage und detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/download](http://www.congen.de/download))
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: [www.congen.de/eifu/](http://www.congen.de/eifu/))
- Validierungsreport auf Anfrage

#### **4.2 Technischer Support**

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

#### **4.3 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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



## **1 General Information**

### **1.1 Description**

SureFood® GMO QUANT 35S Corn is a real-time PCR for the detection of the relative 35S CaMV promoter DNA amount to the total corn DNA content. Therefore, the kit contains two PCR systems, one for detection of a 35S CaMV promoter-specific gene and one for the detection of a corn gene (reference gene).

This kit can be used for the quantitative detection of genetically modified organisms (GMOs) in food, feed and seeds.

The specific detection is according to the official collection of detection methods of §64 German food law.

The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The internal technical verification of instruments was performed on Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96 Dx/Opus, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Roche LightCycler® 480 II.

### **1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification**

The SureFood® GMO QUANT 35S Corn specific PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA-copies. This is equivalent to approx. 0.01% for unprocessed corn grain.

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 the reference gene are present, the relative quantitation limit for 35S corn DNA is 0.1%.

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.

# SureFood® GMO QUANT 35S Corn

## (2 x 50 rxn)

Art. No. S2020

June 2025

### 1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. No. F1060) and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053) is recommended. SureFood® PREP Add On (Art. No. S1055) 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        | Corn Reaction Mix              | 1 x 1050 µl | Orange     |
| 2        | 35S Reaction Mix               | 1 x 1050 µl | Yellow     |
| 3        | Taq Polymerase                 | 1 x 80 µl   | Dark Red   |
| 4        | Dilution Buffer                | 1 x 1400 µl | White      |
| 5        | Standard DNA                   | 1 x 45 µl   | Dark Blue  |
| 6        | Positive Control (1% 35S corn) | 1 x 95 µl   | Light Blue |

**Store all reagents at -28 to -16°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. No. S1055 / SureFast® Mag PREP Food Art. No. F1060)
- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

### 1.6 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

# SureFood® GMO QUANT 35S Corn (2 x 50 rxn)

Art. No. S2020

June 2025

## 1.7 Setup

|                                        | Blockcycler &<br>R-Biopharm RIDA®CYCLER | Rotorcycler       |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| Initial Denaturation (HOLD)<br>Cycles  | 5 min, 95°C<br>45                       | 1 min, 95°C<br>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           |

## 1.8 Detection channel Set-up

| Real-time PCR device      | Detection | Detection channel | Quencher | Note                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------|-----------|-------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agilent AriaDx /Mx        | 35S       | FAM               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
|                           | corn      | FAM               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| Bio-Rad CFX96/Dx/Opus     | 35S       | FAM               | +        | Baseline Settings: <ul style="list-style-type: none"> <li>Baseline subtracted curve fit</li> <li>Apply fluorescence drift correction</li> </ul>                                                                |
|                           | corn      | FAM               | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER    | 35S       | green             | +        | <b>Ignore cycles before</b> , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cyclor operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter. |
|                           | corn      | green             | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| Qiagen Rotor-Gene Q       | 35S       | green             | +        | <b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.                                                                                      |
|                           | corn      | green             | +        |                                                                                                                                                                                                                |
| Roche LightCycler® 480 II | 35S       | 465-510           | +        | For the quantitative analysis use the type "Fit Points"                                                                                                                                                        |
|                           | corn      | 465-510           | +        |                                                                                                                                                                                                                |

## **2 Quantitative Analysis**

### **2.1 Protocol**

#### **2.1.1 Preparation of the master-mix**

Calculate the total number of reactions needed (samples, control reactions and standards) for the specific PCR assay.

##### **Reactions needed for the corn detection:**

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls\* (1x negative control, 2x Positive Control)

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

##### **Reactions needed for the 35S detection:**

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls\* (1x negative control, 2x 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 by vortexing and centrifuge before opening and use.

##### **Example for the calculation and preparation of 10 reactions:**

| <b>Components of the master-mix</b> | <b>Amount per reaction</b> | <b>10 reactions (with 10% excess)</b> |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Reaction Mix                        | 19.3 µl                    | 212.3 µl                              |
| Taq Polymerase                      | 0.7 µl                     | 7.7 µl                                |
| <b>Total volume</b>                 | <b>20 µl</b>               | <b>220 µl</b>                         |

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

##### **\* Description of the reactions**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – only PREP reagents
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

## 2.1.2 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 reference gene (**corn**) and the detection gene (**35S**). Prepare 5 dilutions of the supplied Standard DNA (**Code 5**) with the supplied Dilution Buffer (**Code 4**). Prepare 5 reaction tubes (labeled S1 to S5) and add 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) each.

The following procedure is recommended:

| Standard | Dilutions                                 | 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    | 1,000 copies       | 5,000 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.

## 2.1.3 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control and the standard dilutions into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates 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 calculation for both reaction systems (**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 reference gene system (**corn**). 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 **corn** and **35S** the relative 35S content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

|                    |               |                              |               |
|--------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| Sample <b>35S</b>  | 1,350 copies  | Positive Control <b>35S</b>  | 400 copies    |
| Sample <b>corn</b> | 45,000 copies | Positive Control <b>corn</b> | 28,000 copies |

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

**35S** DNA content = **35S** copy number \* 100 / **corn** copy number

sample **35S** DNA content =  $1,350 * 100 / 45,000$

sample **35S** DNA content = 3%

For the given example the numbers lead to a **35S** DNA 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 of the true percentage value of the Positive Control (1% **35S** content) and the measured percentage of the Positive Control.

$K = \text{true value} / \text{measured value}$

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

The measured DNA content for the sample is multiplied with K to obtain a corrected DNA content.

sample DNA content = measured sample DNA content \* K      sample (example) =  $3.0\% * 0.7 = 2.1\%$

For this example the **35S content is 2.1%**.

### **3 Limitations of the method**

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- In highly processed samples, the limit of detection may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.

### **4 Further Information**

#### **4.1 Product Information**

- Microsoft Excel template of calculation and detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: [www.congen.de/en/downloads](http://www.congen.de/en/downloads))
- Product-related documents (Download: [www.congen.de/en/eifu/](http://www.congen.de/en/eifu/))
- Validation Report upon request

#### **4.2 Technical Support**

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

#### **4.3 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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

