

CONGEN

SureFood® GMO QUANT GT73 Canola

Art. No. S2061
2 x 50 rxn

User Manual



June 2023

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.6	Geräteeinstellungen	5
1.7	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	6
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
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 and Limit of Quantification	9
1.3	DNA-preparation	9
1.4	Kit components and storage	10
1.5	Additionally required equipment and materials	10
1.6	Setup	11
1.7	Detection channel Set-up	11
2	Quantitative Analysis	12
2.1	Protocol	12
2.1.1	Preparation of the master-mix	12
2.1.2	Preparation of the standard DNA dilutions	12
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix	13
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 QUANT GT73 Canola ist eine real-time PCR zur relativen quantitativen Bestimmung des GT73 Raps-DNA Anteils zum gesamten Raps-DNA Anteil. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis von GT73 Raps (OECD Bezeichnung MON-00073-7) und ein real-time PCR-System für den Nachweis von Raps (Referenz) verwendet.

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

Der spezifische Nachweis ist angelehnt am validierten Verfahren der Europäischen Kommission.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX96 Opus und Agilent AriaDx.

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die SureFood® GMO QUANT GT73 Canola real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht unbehandelten Rapskörnern von ca. 0,01 %.

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

Die Bestimmungsgrenze für die GT73 Raps spezifische PCR ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für GT73 Raps 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 Querempfindlichkeiten

Das Raps-Nachweisverfahren weist Querempfindlichkeiten zu Kreuzblüten-Gewächsen (*Brassicacea*) auf, d.h. eine Quantifizierung eines GT73 Raps-Anteils ist nur in einer Probe möglich, bei der bekannt ist, dass außer Raps keine weiteren Kreuzblütengewächse enthalten sind. So ist z.B. eine GT73 Raps Quantifizierung in einer Senf-Probe nicht möglich.

1.4 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.

1.5 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Canola Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	GT73 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% GT73 Raps)	1 x 95 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.

1.6 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

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler	Rotorcycler
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

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaDx /Mx	GT73 Raps	FAM	+	
	Raps	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	GT73 Raps	FAM	+	
	Raps	FAM	+	
Roche LightCycler® 480 II	GT73 Raps	465-510	+	
	Raps	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 Raps-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 GT73 Raps-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:

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 der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Referenzgen- (**Raps**) und der Nachweisgen- (**GT73 Raps**) 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 je µl	Gesamtkopienanzahl 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 (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 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 (**Raps**, **GT73 Raps**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisgen (**GT73 Raps**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Referenzgen (**Raps**) 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 (**GT73 Raps**) zum Referenzgen (**Raps**) ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

Probe GT73 Raps	1.350 Kopien	Positive Control GT73 Raps	400 Kopien
Probe Raps	45.000 Kopien	Positive Control Raps	28.000 Kopien

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

GT73 Raps Anteil = **GT73 Raps** Kopienzahl * 100 / **Raps** Kopienzahl

Proben-DNA **GT73 Raps** Anteil = $1.350 * 100 / 45.000$ Proben-DNA **GT73 Raps** Anteil = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **GT73 Raps** 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 % **GT73 Raps** -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 **GT73 Raps Anteil von 2,1 %** für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Microsoft Excel Berechnungsvorlage und detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Verifizierungsdaten 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

SureFood® GMO QUANT GT73 Canola is a real-time PCR for the detection of the relative GT73 canola DNA amount to the total canola DNA content. Therefore, the kit contains two PCR systems, one for detection of a GT73 canola specific gene (OECD unique identifier MON-ØØØ73-7) and one for the detection of a canola 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 validated method of the European Commission.

The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX96 Opus and Agilent AriaDx.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The SureFood® GMO QUANT GT73 Canola specific PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA-copies. This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed canola 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 GT73 canola 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.

1.3 Cross reactivity

Cross reactivity was observed with DNA extracts from *Brassicaceae* family. That means that quantification is only possible for samples in which canola material is known to be the only *Brassicaceae* type. Therefore the GT73 canola quantification in a mustard sample is not possible.

SureFood® GMO QUANT GT73 Canola (2 x 50 rxn)

Art. No. S2061

June 2023

1.4 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.

1.5 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Canola Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	GT73 canola 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% GT73 canola)	1 x 95 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.

1.6 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

SureFood® GMO QUANT GT73 Canola (2 x 50 rxn)

Art. No. S2061

June 2023

1.7 Setup

	Blockcycler	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

1.8 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaDx /Mx	GT73 canola	FAM	+	
	canola	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	GT73 canola	FAM	+	
	canola	FAM	+	
Roche LightCycler® 480 II	GT73 canola	465-510	+	
	canola	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 canola detection:

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls (1x no-template control, 2x Positive Control)

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

Reactions needed for the GT73 canola detection:

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls (1x no-template 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:

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 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 (**canola**) and the detection gene (**GT73 canola**). 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 (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 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 (**canola**, **GT73 canola**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**GT73 canola**) 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 (**canola**). 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 **canola** and **GT73 canola** the relative **GT73 canola** content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

Sample GT73 canola	1,350 copies	Positive Control GT73 canola	400 copies
Sample canola	45,000 copies	Positive Control canola	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.

GT73 canola DNA content = **GT73 canola** copy number * 100 / **canola** copy number

sample **GT73 canola** DNA content = 1,350 * 100 / 45,000 sample **GT73 canola** DNA content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **GT73 canola** 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 % **GT73 canola** 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 **GT73 canola content is 2.1 %**.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Microsoft Excel template of calculation and detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Verification 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

r-biopharm®

