

CONGEN

**SureFood® GMO SCREEN 4plex
35S/NOS/FMV+IAC**

Art. No. S2126
100 rxn

User Manual



September 2022

 **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 35S/NOS/FMV+IAC ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung folgender spezifischer DNA-Sequenzen.

- 35S Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV)
- NOS Terminator aus dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*
- 34S FMV Promotors aus dem Figwortmosaikvirus

Dieser Test dient dem Screening nach gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut.

Die Nachweise sind angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ausgestattet. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

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 Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien.

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.

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen* zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein C_p-Wert vor 20 erreicht wird.

* z.B. 99,9 % Roundup Ready Soja (35S, NOS) und 0,1 % Roundup Ready 2 Yield Soja (FMV)

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	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°C zu lagern.

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 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)	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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	35S	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	FMV	ROX	+	
	NOS	Cy5	+	
Agilent AriaMx / Dx	35S	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	FMV	ROX	+	
	NOS	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	35S	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	FMV	ROX	None	
	NOS	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx	35S	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	FMV	ROX	+	
	NOS	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	35S	green	+	
	IAC	yellow	+	
	FMV	orange	+	
	NOS	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	35S	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	FMV	533-610	+	
	NOS	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	35S	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	540-580	+	
	FMV	540-610	+	
	NOS	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 und Positivkontrolle. Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen 35S-, NOS- und FMV-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	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 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 35S, im ROX-Kanal der Parameter FMV und im Cy5-Kanal der Parameter NOS detektiert (Siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist. Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **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 35S, NOS oder FMV mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

In einigen Fällen kann es vorkommen, dass nur eine der beiden DNA-Duplikate, die aus der Untersuchungsprobe extrahiert wurden, 35S und/oder NOS und/oder FMV **positiv** ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Menge an gentechnisch veränderter DNA in der Probe sehr gering ist und an der Nachweisgrenze liegt. Wenn ein solches Ergebnis auch nach mindestens zweimaliger Wiederholung der Analyse vorliegt, wird die Probe als negativ beurteilt.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal 35S	ROX-Kanal FMV	Cy5-Kanal NOS	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	35S DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	FMV DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	NOS DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Ziel DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Hinweis: Der 35S Promotor stammt ursprünglich aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV). Dessen Wirt sind *Brassicaceae* (Kreuzblütengewächse). Deshalb kann beim 35S Promotor Nachweis auch ein natürlicher Befall mit diesem Virus detektiert werden. Um auszuschließen, dass ein alleiniges 35S Signal vom CaMV stammt, wird der spezifische Nachweis mit dem SureFood® GMO SCREEN CaMV Kit (Art. Nr. S2027) empfohlen.

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 35S/NOS/FMV+IAC is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of following specific DNA sequences.

- 35S promoter of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV),
- NOS terminator of the soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens*
- FMV promoter from figwort mosaic virus

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

The detections are according to the official collection of detection methods of §64 German food law.

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). If the DNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

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 verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies.

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.

Note: Inconsistent mixing ratios* may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (Cp value < 20).

* e.g. 99.9 Roundup Ready Soya (35S, NOS) and 0.1 % Roundup Ready 2 Yield Soya (FMV)

SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (100 rxn)

Art. No. S2126

September 2022

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	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°C and protected from light.

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 with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- 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 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

**SureFood® GMO SCREEN 4plex
35S/NOS/FMV+IAC
(100 rxn)**

Art. No. S2126

September 2022

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	35S	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	FMV	ROX	+	
	NOS	Cy5	+	
Agilent AriaMx / Dx	35S	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	FMV	ROX	+	
	NOS	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	35S	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	FMV	ROX	None	
	NOS	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx	35S	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	FMV	ROX	+	
	NOS	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	35S	green	+	
	IAC	yellow	+	
	FMV	orange	+	
	NOS	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	35S	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	533-580	+	
	FMV	533-610	+	
	NOS	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	35S	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	540-580	+	
	FMV	540-610	+	
	NOS	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. The reaction mix contains an internal amplification control (IAC) per reaction.

Reactions needed for the qualitative 35S, NOS and FMV 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	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 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 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.

35S DNA is detected in the FAM-channel, FMV DNA is detected in the ROX-channel and NOS DNA is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC)

A Cp value for the internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the negative control. If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel 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 35S, NOS or FMV PCR assay.

It may appear in some cases that only one of the two DNA duplicates prepared from the test sample is 35S and/or NOS and/or FMV **positive**. This indicates that the amount of genetically modified DNA is very low and at the limit of detection. If such results are obtained in at least two repetitions of the analysis, the sample is stated negative.

result in the respective channel				Interpretation
FAM channel 35S	ROX channel FMV	Cy5 channel NOS	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	negative	positive/negative	35S DNA detected
negative	positive	negative	positive/negative	FMV DNA detected
negative	negative	positive	positive/negative	NOS DNA detected
negative	negative	negative	positive	Negative, target DNA is not detected
negative	negative	negative	negative	invalid

Note: The 35S promoter is originally derived from the Cauliflower Mosaic Virus. *Brassicaceae* species are the host of the CaMV. Therefore, the analysis for the 35S promoter also detects the naturally occurring virus. It is possible that a sample containing the virus yields a positive result, although no GMO is present. As a supplementary kit, please use the SureFood® GMO SCREEN CaMV kit (Art. No. S2027), which helps to assure the absence of the natural Cauliflower Mosaic Virus in the sample in case of a single positive 35S result.

SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (100 rxn)

Art. No. S2126

September 2022

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

