

CONGEN

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

Art. No. S2127
100 rxn

User Manual



September 2025

 Inhalt

1	Allgemeines	4
1.1	Beschreibung	4
1.2	Nachweisgrenze	4
1.3	DNA-Präparation	5
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	5
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	5
1.6	Vorsichtsmaßnahmen	5
1.7	Geräteeinstellungen	6
1.8	Detektionskanaleinstellungen	6
2	Qualitative Analyse	7
2.1	Protokoll	7
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	7
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	8
3	Grenzen der Methode	10
4	Weitere Informationen	10
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	10
4.2	Technischer Support	10
4.3	Vertrieb und Bestellung	10



Content

1	General Information	11
1.1	Description	11
1.2	Limit of Detection	11
1.3	DNA-preparation	12
1.4	Kit components and storage	12
1.5	Additionally required equipment and materials	12
1.6	Precautions for users	12
1.7	Setup.....	13
1.8	Detection channel Set-up	13
2	Qualitative Analysis	14
2.1	Protocol	14
2.1.1	Preparation of the master-mix	14
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	14
2.2	Interpretation of results	15
3	Limitations of the method	17
4	Further Information	17
4.1	Product Information	17
4.2	Technical Support	17
4.3	Distribution and Ordering	17

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

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

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

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 insbesondere der technischen Regel BVL L-00.00-154.

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 interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX Opus 96, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/NPTII/PAT/CTP2:CP4 EPSPS 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 Cp-Wert vor 27 erreicht wird.

* z.B. 99,9 % MON88017 Mais und 0,1 % Bt176 Mais

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

Art. Nr. S2127

September 2025

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 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 190 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 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 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.

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

Art. No. S2127

September 2025

1.7 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

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaDx / Mx	nptII	FAM	+	
	PAT, moPAT	HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	nptII	FAM	+	Baseline Einstellungen: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescnce drift correction
	PAT, moPAT	VIC/HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	nptII	green	+	Achtung: Nur 0.1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	PAT, moPAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	nptII	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	PAT, moPAT	533-580	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	533-610	+	
	BAR	618-660	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	nptII	green	+	Ignore cycles before , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungs- anleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	PAT, moPAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	

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 benötigt: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Positive Control und eine externe Inhibitionskontrolle pro Probe.

Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) empfohlen

Benötigte Reaktionen für den qualitativen BAR, nptII, PAT/moPAT, CTP2:CP4 EPSPS -Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x 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 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 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.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus verwendetem Prep Kit
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügte Positive Control

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 nptII, im VIC/HEX-Kanal der Parameter PAT/moPAT, 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 mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

In einigen Fällen kann es vorkommen, dass nur eine der beiden DNA-Duplikate, die aus der Untersuchungsprobe extrahiert wurden **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				Ergebnis	Interpretation
FAM-Kanal nptII	VIC/HEX-Kanal PAT/moPAT	ROX-Kanal CTP2:CP4 EPSPS	Cy5-Kanal BAR	Externe Inhibitions- kontrolle	
positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	nptII-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	negativ	positiv	PAT/moPAT-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	CTP2:CP4 EPSPS-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	BAR-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ, Ziel-DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Hinweis: Die in der obenstehenden Tabelle dargestellten Ergebnisse dienen lediglich als Beispiel. Darüber hinaus sind weitere Kombinationen möglich.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich
Positive Control (FAM – nptII)	25 ≤ Cp ≤33
Positive Control (VIC/HEX – PAT/moPAT)	25 ≤ Cp ≤33
Positive Control (ROX – CTP2:CP4 EPSPS)	25 ≤ Cp ≤33
Positive Control (CY5 – BAR)	25 ≤ Cp ≤33

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

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

- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validation Report 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.

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
www.r-biopharm.com



1 General Information

1.1 Description

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

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

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 and Feed Code (LFGB), especially according to technical specification BVL L-00.00-154.

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 internal technical verification of instruments was performed on Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX Opus 96, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER, and Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN 4plex BAR/NPTII/PAT/CTP2:CP4 EPSPS 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 < 27).

* e.g. 99.9% MON88017 Corn and 0.1 % Bt176 Corn

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

Art. No. S2127

September 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 samples 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 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 190 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 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 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 SCREEN 4plex BAR/NPTII/PAT/CTP2:CP4 EPSPS (100 rxn)

Art. No. S2127

September 2025

1.7 Setup

	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

1.8 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaDx /Mx	nptII	FAM	+	
	PAT, moPAT	HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	nptII	FAM	+	Baseline Settings: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	PAT, moPAT	VIC/HEX	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	ROX	+	
	BAR	Cy5	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	nptII	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	PAT, moPAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	nptII	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	PAT, moPAT	533-580	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	533-610	+	
	BAR	618-660	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	nptII	green	+	Ignore cycles before , 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.
	PAT, moPAT	yellow	+	
	CTP2:CP4 EPSPS	orange	+	
	BAR	red	+	

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 .

The following control reactions are needed for the specific PCR assay: negative control, extraction control, Positive Control and an external inhibition control per sample.

For the preparation of the inhibition control the use of the SureFood® GMO Plant PLUS (Art. No. S2049) is recommended.

Reactions needed for the qualitative BAR, nptII, PAT/moPAT and CTP2:CP4 EPSPS detection:

3 reactions for controls* (1x negative 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.
- 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.

*** Description of the controls**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – components from used Prep Kit
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

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.

NptII DNA is detected in the FAM-channel, PAT/moPAT 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 PCR assay.

It may appear in some cases that only one of the two DNA duplicates prepared from the test sample is **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.

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

Art. No. S2127

September 2025

Result in the respective channel				Result external inhibition- control	Interpretation
FAM channel nptII	VIC/HEX channel PAT/moPAT	ROX channel CTP2:CP4 EPSPS	Cy5 channel BAR		
positive	negative	negative	negative	positive	nptII DNA detected
negativ	positive	negative	negative	positive	PAT/moPAT DNA detected
negativ	negative	positive	negative	positive	CTP2:CP4 EPSPS DNA detected
negativ	negative	negative	positive	positive	BAR DNA detected
negativ	negative	negative	negative	positive	Negative, target DNA is not detected
negativ	negative	negative	negative	negative	invalid

Note: The results displayed in the table above represent merely an example. Additional combinations are also possible.

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range
Positive Control (FAM – nptII)	$25 \leq Cp \leq 33$
Positive Control (VIC – PAT/moPAT)	$25 \leq Cp \leq 33$
Positive Control (ROX – CTP2:CP4 EPSPS)	$25 \leq Cp \leq 33$
Positive Control (CY5 – BAR)	$25 \leq Cp \leq 33$

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

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

- Product-related documents (Download: 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.

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
www.r-biopharm.com

