

CONGEN

**SureFood® GMO SCREEN
35S/NOS/FMV**

Art. No. S2026

100 rxn

User Manual



April 2019

 **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	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	3
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Qualitative Analyse	5
2.1	Protokoll	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	5
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	5
2.2	Interpretation der Ergebnisse	6
3	Weitere Informationen	7
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	7
3.2	Technischer Support	7
3.3	Vertrieb und Bestellung	7

 **Content**

1	General Information	8
1.1	Description	8
1.2	Limit of Detection and Limit of Quantification.....	8
1.3	DNA-preparation	8
1.4	Kit components and storage	8
1.5	Additionally required equipment and materials	8
1.6	Setup	9
1.7	Detection channel Set-up	9
2	Qualitative Analysis	10
2.1	Protocol	10
2.1.1	Preparation of the master-mix	10
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	10
2.2	Interpretation of results	11
3	Further Information	11
3.1	Product Information	12
3.2	Technical Support	12
3.3	Distribution and Ordering	12

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Dieser Test dient dem Screening nach gentechnisch modifizierten Organismen (GMO) in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut. Hierfür werden PCR-Systeme für den Nachweis der DNA vom 35S CaMV Promotor, vom *A. tumefaciens* NOS Terminator und vom 34S FMV Promotor verwendet. Der Nachweis ist angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB.

Das Kit enthält zusätzlich einen Inhibition Control Mix (Inhibitionskontrolle). Mit dieser Kontrolle wird die DNA auf inhibitorische Substanzen, die die PCR unterdrücken, überprüft. 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 Probenmatrices inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystem 7500 und Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV PCR hat eine Nachweigrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweigrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation von Rohmaterialien wird das SureFood® PREP Basic Kit und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	35S Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	NOS Reaction Mix	2 x 1100 µl	Orange
3	FMV Reaction Mix	2 x 1100 µl	Braun
4	Inhibition Control Mix	2 x 1100 µl	Hellgrün
5	Taq Polymerase	1 x 45 µl	Rot
6	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 oder SureFood® PREP Advanced)
- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäß

SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV (100 Reakt.)

Art. Nr. S2026

April 2019

1.6 Geräteneinstellungen

	Blockcycler/ R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler/ LTF MyGo Pro
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions -kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx,	35S	FAM	+	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	NOS	FAM	+	
	FMV	FAM	+	
	Inhibition Control	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	35S	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	NOS	FAM	None	
	FMV	FAM	None	
	Inhibition Control	FAM	None	
Bio-Rad CFX96	35S	FAM	+	
	NOS	FAM	+	
	FMV	FAM	+	
	Inhibition Control	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	35S	green	+	
	NOS	green	+	
	FMV	green	+	
	Inhibition Control	green	+	
LTF MyGo Pro	35S	FAM	+	
	NOS	FAM	+	
	FMV	FAM	+	
	Inhibition Control	FAM	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	35S	green	+	
	NOS	green	+	
	FMV	green	+	
	Inhibition Control	green	+	
Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer	35S	465-510	+	
	NOS	465-510	+	
	FMV	465-510	+	
	Inhibition Control	465-510	+	

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: Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen 35S-Nachweis:

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

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den qualitativen NOS-Nachweis:

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

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den qualitativen FMV-Nachweis:

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

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den Inhibition Control Mix:

1 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle)

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 Reaktionsgefäß. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäß. Verschließen der Reaktionsgefäß.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäß mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäß 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.

Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im 35S-, NOS- oder FMV-System zeigt.

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.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation in den Nachweissystemen zeigt und die Inhibition Control keine Inhibition anzeigt.

Zur Auswertung der Inhibition Control wird das Signal der Proben-DNA mit dem Signal der Negativkontrolle (Reaktion ohne Probenzugabe) verglichen. Bei einem positiven Signal der Proben-DNA mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle wird die Reaktion nicht durch PCR-inhibitorische Substanzen gestört. Die Proben-DNA kann unverdünnt in das spezifische Nachweissystem eingesetzt werden.

Sollte die Proben-DNA in der Inhibition Control keine Amplifikation oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle (Reaktion ohne Probenzugabe) 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 1:5 bis 1:10 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Die Nachweisgrenze für die Probe verändert sich im spezifischen Nachweissystem mit dem gewählten Verdünnungsfaktor.

Bei der Inhibition Control handelt es sich um ein heterologes PCR-System, das sich abweichend vom Nachweissystem verhalten kann.

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.

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

3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung 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



1 General Information

1.1 Description

This kit can be used for screening of genetically modified organisms (GMOs) in food, feed and seeds. For this purpose, PCR systems for detection of the DNA sequences from 35S CaMV promoter, *A. tumefaciens* NOS terminator and 34S FMV promoter are applied. The kit is according to German Food Law § 64 for the detection of genetically modified DNA sequences.

Additionally the kit contains an Inhibition Control to examine DNA for inhibiting substances which interfere with the PCR mix. Some examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). Also spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, BioRad CFX 96, Roche LightCycler® 480 II, Applied Biosystem 7500 and Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV 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.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	35S Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	NOS Reaction Mix	2 x 1100 µl	Orange
3	FMV Reaction Mix	2 x 1100 µl	Brown
4	Inhibition Control Mix	2 x 1100 µl	Light Green
5	Taq Polymerase	1 x 45 µl	Red
6	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 or SureFood® PREP Advanced)
- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, capillaries, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

SureFood® GMO SCREEN 35S/NOS/FMV (100 React.)

Art. No. S2026

April 2019

1.6 Setup

	Blockcycler / R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler/ LTF MyGo Pro
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx,	35S	FAM	+	
	NOS	FAM	+	
	FMV	FAM	+	
	Inhibition Control	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	35S	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	NOS	FAM	None	
	FMV	FAM	None	
	Inhibition Control	FAM	None	
Bio-Rad CFX96	35S	FAM	+	
	NOS	FAM	+	
	FMV	FAM	+	
	Inhibition Control	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	35S	green	+	
	NOS	green	+	
	FMV	green	+	
	Inhibition Control	green	+	
LTF MyGo Pro	35S	FAM	+	
	NOS	FAM	+	
	FMV	FAM	+	
	Inhibition Control	FAM	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	35S	green	+	
	NOS	green	+	
	FMV	green	+	
	Inhibition Control	green	+	
Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer	35S	465-510	+	
	NOS	465-510	+	
	FMV	465-510	+	
	Inhibition Control	465-510	+	

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). Recommended control reactions: negative control, positive control, extraction control and an inhibition control.

Reactions needed for the qualitative 35S detection:

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1 positive control)

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

Reactions needed for the qualitative NOS detection:

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1 positive control)

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

Reactions needed for the qualitative FMV detection:

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1 positive control)

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

Reactions needed for the inhibition control:

1 reactions for controls (1x no-template 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 or capillaries.
- 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 or capillaries and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates or capillaries 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 need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the 35S-, NOS- and/or FMV-system.

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.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system and the inhibition control shows no inhibitory effects.

For evaluation of the inhibition control, the signal of the sample DNA is compared to the signal of the no-template control (reaction without sample DNA). If the sample DNA shows a positive signal with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the no-template control, the reaction is not influenced by PCR inhibiting substances. The DNA can be used directly for the specific detection system.

If the sample DNA shows no amplification in the inhibition control or a shift in Cp-value > 2 compared to the no-template control (reaction without sample DNA), 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 1:5 to 1:10 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific PCR assay.

The inhibition control is a heterologous PCR system. It can be influenced by other factors than the specific detection system.

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.

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

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

