

**CONGEN**

# **SureFood<sup>®</sup> GMO Plant PLUS**

Art. No. S2049  
100 rxn

## **User Manual**



**July 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 .....	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	6
3.2	Technischer Support .....	6
3.3	Vertrieb und Bestellung .....	6



## **Content**

1	General Information .....	7
1.1	Description .....	7
1.2	Limit of Detection and Limit of Quantification .....	7
1.3	DNA-preparation .....	7
1.4	Kit components and storage .....	7
1.5	Additionally required equipment and materials .....	7
1.6	Setup .....	8
1.7	Detection channel Set-up .....	8
2	Qualitative Analysis .....	9
2.1	Protocol .....	9
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	9
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	9
2.2	Interpretation of results .....	10
3	Further Information .....	10
3.1	Product Information .....	10
3.2	Technical Support .....	10
3.3	Distribution and Ordering .....	10

## 1 Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird Pflanzen-DNA qualitativ nachgewiesen.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet (IAC). 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 zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Agilent AriaDx, R-Biopharm RIDA®CYCLER sowie am Agilent Mx3005P.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO Plant PLUS real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von der Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und dem DNA-Gehalt.

### 1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Basic und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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)
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

**1.6 Geräteeinstellungen**

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

**1.7 Detektionskanaleinstellungen**

<b>Real-time PCR Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektionskanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	Pflanzen	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Pflanzen	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Pflanzen	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Pflanzen	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	Pflanzen	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Pflanzen	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Pflanzen	530	None	Das SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) wird benötigt. Stellen Sie die Seek Temperature auf 58°C.
	IAC	560	None	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Pflanzen	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Pflanzen	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

## 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 Pflanzen-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.

Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

#### **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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**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 Reaktionsgefäße.
- 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 Pflanzen detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Pflanzen bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter Pflanzen bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung  $\leq 2$  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 Pflanzen mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

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



## 1 General Information

### 1.1 Description

The test detects DNA of plants qualitatively.

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 two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Agilent AriaDx, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent Mx3005P.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO ID Plant PLUS real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies.

The limit of detection of the complete method (DNA extraction and real-time PCR) 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	Reaction Mix	2 x 1100 $\mu$ l	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 $\mu$ l	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 $\mu$ l	Light Blue

**Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  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)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumables (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**

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

<b>Real-time PCR device</b>	<b>Detection</b>	<b>Detection channel</b>	<b>Quencher</b>	<b>Note</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	plants	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	plants	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	plants	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	plants	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	plants	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	plants	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	plants	530	None	The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) is required. Check the Seek Temperature is 58°C.
	IAC	560	None	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	plants	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	plants	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

## 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 detection of plants:

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

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.

The tube of the Taq Polymerase should be kept at -20°C and not be mixed by vortexing.

#### 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
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**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.

Plants DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for plants, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel.

A sample is stated **negative** for plants, if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-Value  $\leq 2$  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 plants PCR assay.

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

