

CONGEN

SureFood® GMO QUANT Bt176 Corn

Art. No. S2015
2 x 50 rxn

User Manual



August 2023

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	4
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	10
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	Qualitative 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 Bt176 Corn ist eine real-time PCR zur relativen quantitativen Bestimmung des Bt176 Mais-DNA Anteils zum gesamten Mais-DNA Anteil. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis von Bt176 Mais (OECD Bezeichnung SYN-EV176-9) und ein real-time PCR-System für den Nachweis von Mais (Referenz) verwendet.

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

Der spezifische Nachweis ist angelehnt an der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ nach § 64 LFGB.

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

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die SureFood® GMO QUANT Bt176 Corn real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht unbehandelten Maiskörnern von ca. 0,01 %.

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

Die Bestimmungsgrenze für die Bt176 Mais spezifische PCR ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für Bt176 Mais 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 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	Corn Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	Bt176 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% Bt176 Mais)	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.

1.5 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
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaDx /Mx	Bt176 Mais	FAM	+	
	Mais	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Bt176 Mais	FAM	+	
	Mais	FAM	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Bt176 Mais	green	+	Achtung: Nur 0.1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	Mais	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Bt176 Mais	465-510	+	
	Mais	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 Mais-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 Bt176 Mais-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- (**Mais**) und der Nachweisgen- (**Bt176 Mais**) 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.

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 Bt176 Corn is a real-time PCR for the detection of the relative Bt176 corn DNA amount to the total corn DNA content. Therefore, the kit contains two PCR systems, one for detection of a Bt176 corn-specific gene (OECD unique identifier SYN-EV176-9) and one for the detection of a corn 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 official collection of detection methods of §64 German food law.

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, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Opus, Bio-Rad CFX96 Dx and Agilent AriaDx.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The SureFood® GMO QUANT Bt176 Corn specific PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA-copies. This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed corn 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 Bt176 corn 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.

SureFood® GMO QUANT Bt176 Corn

(2 x 50 rxn)

Art. No. S2015

August 2023

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	Corn Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	Bt176 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% Bt176 corn)	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.

1.5 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
- 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 Bt176 Corn (2 x 50 rxn)

Art. No. S2015

August 2023

1.6 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

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaDx/Mx	Bt176 corn	FAM	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	corn	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Bt176 corn	FAM	+	
	corn	FAM	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Bt176 corn	green	+	
	corn	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Bt176 corn	465-510	+	
	corn	465-510	+	

2 Qualitative 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 corn 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 Bt176 corn 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 (**corn**) and the detection gene (**Bt176 corn**). 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 (**corn**, **Bt176 corn**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**Bt176 corn**) 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 (**corn**). 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 **corn** and **Bt176 corn** the relative Bt176 corn content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

Sample Bt176 corn	1,350 copies	Positive Control Bt176 corn	400 copies
Sample corn	45,000 copies	Positive Control corn	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.

Bt176 corn DNA content = **Bt176 corn** copy number * 100 / **corn** copy number

sample **Bt176 corn** DNA content = 1,350 * 100 / 45,000 sample **Bt176 corn** DNA content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **Bt176 corn** 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 % **Bt176 corn** 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 **Bt176 corn 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®

