

CONGEN

SureFood® GMO SCREEN P35S:BAR Rice

Art. No. S2022
2 x 50 rxn

User Manual



March 2023

 **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	5
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.....	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 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 P35S:BAR ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz des P35S:BAR Konstrukt aus P35S:BAR. Dieses Konstrukt ist im LibertyLink 601 (LL601 - OECD Bezeichnung BCS-OS003-7) und LibertyLink 62 (LL62 - OECD Bezeichnung ACS-OS002-5) Reis integriert, ist aber auch Bestandteil u.a. im StarLink Mais und Bt176 Mais. Der P35S:BAR Kit enthält zusätzlich ein Referenz-PCR System für Reis.

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

Der Nachweis ist angelehnt am validierten Verfahren der Europäischen Kommission ("Report on the verification of a construct-specific detection method for identification of Rice GM-events containing P35S:BAR using a real-time PCR assay" vom Joint Research Centre, dem Referenzlabor der Europäischen Kommission).

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, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx und Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO SCREEN P35S:BAR Rice real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht bei unbehandelten Reiskörnern ca. 0,01 %.

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.

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	Rice Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	P35S:BAR Reaction Mix	1 x 1050 µl	Gelb
3	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
4	Positive Control	1 x 190 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 & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LTF MyGo Pro
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

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
Agilent AriaDx /Mx	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	Rice	FAM	+	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	P35S:BAR	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
LTF MyGo Pro	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Rice	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	P35S:BAR	yellow	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rice	green	+	
	P35S:BAR	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Rice	465-510	+	
	P35S:BAR	533-580	+	

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 und eine Inhibitionskontrolle.

Für die Durchführung der externen Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) oder des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC Kit (Art. Nr. S2126) empfohlen.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen P35S:BAR-Nachweis:

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

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Rice-Nachweis:

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

Jede 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 (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.

Eine Probe wird **positiv** in Bezug auf LL601 / LL62 Reis bewertet, wenn die Proben-DNA sowohl im P35S:BAR-System als auch im Reis-Referenz-System eine Amplifikation zeigt. Falls nur im P35S:BAR-System eine Amplifikation beobachtet wird, handelt es sich nicht um LL601 / LL62 Reis sondern um eine gentechnische Veränderung einer anderen Pflanzenart, welche ebenfalls das P35S:BAR Konstrukt enthält.

Eine Probe wird als **negativ** in Bezug auf das P35S:BAR Konstrukt bewertet, wenn die Proben-DNA im P35S:BAR-System keine Amplifikation zeigt.

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 für P35S:BAR und Reis mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen System			
FAM-Kanal P35S:BAR	FAM-Kanal Reis	Externe Inhibitions- kontrolle	Interpretation
positiv	positiv	positiv	LL601 / LL62 Reis DNA nachweisbar
positiv	negativ	positiv	P35S:BAR DNA nachweisbar
negativ	positiv	positiv	Reis DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	negativ, Ziel DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	Ungültig

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- 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



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® GMO SCREEN P35S:BAR Rice is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific P35S:BAR constructDNA sequence of P35S:BAR. The LibertyLink 601 (LL601 - OECD unique identifier BCS-OS003-7) Rice and the LibertyLink 62 (LL62 - OECD unique identifier ACS-OS002-5) Rice contains this genetically construct but it is also present in other GMOs as StarLink Corn and Bt176 Corn. Additionally, the kit contains a reference PCR system for the detection of Rice.

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

The specific detection is according to the validated method of the European Commission ("Report on the verification of a construct-specific detection method for identification of Rice GM-events containing P35S:BAR using a real-time PCR assay" from the Joint Research Centre, the Community Reference Laboratory).

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO SCREEN P35S:BAR Rice real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies. This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed Rice grain.

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.

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	Rice Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	P35S:BAR Reaction Mix	1 x 1050 µl	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
4	Positive Control	1 x 190 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

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 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 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
Agilent AriaDx /Mx	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	Rice	FAM	+	Check the passive reference option ROX is none.
	P35S:BAR	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
LTF MyGo Pro	Rice	FAM	+	
	P35S:BAR	FAM	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Rice	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	P35S:BAR	yellow	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rice	green	+	
	P35S:BAR	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Rice	465-510	+	
	P35S:BAR	533-580	+	

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 and inhibition control.

For the preparation of the external inhibition control the use of the SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) or the SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC kit (Art. No. S2126) respectively, is recommended.

Reactions needed for the qualitative P35S:BAR detection:

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

Reactions needed for the qualitative Rice 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	19.3 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 (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.

A sample is stated **positive** for LL601 / LL62 Rice, if the sample DNA shows an amplification both in the P35S:BAR system and the Rice reference system. If only the reaction with sample DNA in the P35S:BAR system is **positive** the sample does not contain LL601 / LL62 Rice. This indicates, that the sample includes a genetically modification of another plant species where the P35S:BAR construct is integrated in the genome.

A sample is stated **negative** for P35S:BAR, if the sample DNA shows no amplification in the P35S:BAR system.

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 P35S:BAR and Rice PCR assay.

result in the respective system			
FAM-channel P35S:BAR	FAM-channel Rice	external inhibition control	Interpretation
positive	positive	positive	LL601 / LL62 Reis DNA detected
positive	negative	positive	P35S:BAR DNA detected
negative	positive	positive	Rice DNA detected
negative	negative	positive	Negative, target DNA not detected
negative	negative	negative	invalid

3 Further Information

3.1 Product Information

- 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

