

CONGEN

SureFood® GMO ID Bt63 Rice

Art. No. S2024
2 x 50 rxn

User Manual



August 2025

 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	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.7	Geräteeinstellungen	5
1.8	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	Grenzen der Methode	8
4	Weitere Informationen	8
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
4.2	Technischer Support	8
4.3	Vertrieb und Bestellung	8



Content

1 General Information9

1.1 Description9

1.2 Limit of Detection9

1.3 DNA-preparation10

1.4 Kit components and storage10

1.5 Additionally required equipment and materials10

1.6 Precautions for users10

1.7 Setup.....11

1.8 Detection channel Set-up11

2 Qualitative Analysis12

2.1 Protocol12

2.1.1 Preparation of the master-mix12

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix12

2.2 Interpretation of results13

3 Limitations of the method14

4 Further Information14

4.1 Product Information14

4.2 Technical Support14

4.3 Distribution and Ordering14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® GMO ID Bt63 Rice ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis der spezifischen gentechnisch modifizierten Bt63 Reis DNA-Sequenz.

Für die Identifizierung wird ein Konstrukt spezifisches real-time PCR-System für den Nachweis von Bt63 Reis (OECD Bezeichnung HZU-HHØØ1-9) verwendet.

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

Der Nachweis ist angelehnt an der publizierten Methode von: D. Maede et al.; European Food Research and Technology, 224:271-278 (2006) und daher auch entsprechend der Kommission Entscheidung 2008/289/EC.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Bio-Rad CFX96, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO Bt63 Rice 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.

SureFood® GMO ID Bt63 Rice (2 x 50 rxn)

Art. Nr. S2024

August 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	Rice Reaction Mix	1 x 1050 µl	Orange
2	Bt63 Rice 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 -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
- 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.

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 Mx3005P	Rice	FAM	+	
	Bt63	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Rice	FAM	+	Baseline Einstellungen: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	Bt63	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rice	green	+	Ignore cycles before , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cyding-Analyse.
	Bt63	green	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Rice	green	+	Achtung: Nur 0.1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	Bt63	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Rice	465-510	+	
	Bt63	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 benötigt: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Positive Control und eine Inhibitionskontrolle.

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

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Bt63-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Reis -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.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation 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 für Bt63 und Reis mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich
Negativkontrolle	negativ
Positive Control (FAM – Rice)	$25 \leq Cp \leq 33$
Positive Control (FAM – Bt63 Rice)	$25 \leq Cp \leq 33$

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/)
- Validierungsreport 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 ID Bt63 Rice is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific genetically modified Bt63 rice DNA sequence.

Therefore, the kit contains a construct specific real-time PCR system for the Bt63 rise (OECD unique identifier HZU-HHØØ1-9).

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

The specific detection is according to the method published by: D. Maede et al.; European Food Research and Technology, 224:271-278 (2006) and therefore according to Commission decision 2008/289/EC.

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

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO Bt63 Rice 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.

SureFood® GMO ID Bt63 Rice (2 x 50 rxn)

Art. No. S2024

August 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 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	Bt63 Rice 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 -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
- 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 ID Bt63 Rice (2 x 50 rxn)

Art. No. S2024

August 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 Mx3005P	Rice	FAM	+	
	Bt63	FAM	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Rice	FAM	+	Baseline Settings: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	Bt63	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rice	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 cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	Bt63	green	+	
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.
	Bt63	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Rice	465-510	+	
	Bt63	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) for the specific PCR assay.

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

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

Reactions needed for the qualitative Bt63 detection:

3 reactions for controls* (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

Reactions needed for the qualitative Rice 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.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification 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 Bt63 and Rice PCR assay.

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range
negative control	negative
Positive Control (FAM – Rice)	$25 \leq Cp \leq 33$
Positive Control (FAM – Bt63 Rice)	$25 \leq Cp \leq 33$

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

