

CONGEN

**SureFood® ANIMAL ID 3plex
Horse/Donkey+IAAC**

Art. No. S6119

100 rxn

User Manual



January 2019

 Inhalt /  Content

1	Allgemeines	2
1.1	Beschreibung	2
1.2	Nachweisgrenze	2
1.3	DNA-Präparation	2
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	2
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	2
1.6	Geräteeinstellungen	3
2	Qualitative Analyse	3
2.1	Protokoll	3
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	3
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	4
2.2	Interpretation der Ergebnisse	4
3	Weitere Informationen	5
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	5
3.2	Technischer Support	5
3.3	Vertrieb und Bestellung	5
1	General Information	6
1.1	Description	6
1.2	Limit of Detection	6
1.3	DNA-preparation	6
1.4	Kit components and storage	6
1.5	Additionally required equipment and materials	6
1.6	Setup	7
2	Qualitative Analysis	7
2.1	Protocol	7
2.1.1	Preparation of the master-mix	7
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	8
2.2	Interpretation of results	8
3	Further Information	9
3.1	Product Information	9
3.2	Technical Support	9
3.3	Distribution and ordering	9

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird Pferde-DNA (*Equus caballus*) und Esel-DNA (*Equus asinus*) getrennt nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA ausgestattet (IAAC). Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm und 670 nm (FAM, VIC und Cy5) detektieren können. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, BMS MIC, Agilent AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ANIMAL ID 3plex Horse/Donkey+IAAC real-time PCR ist so ausgelegt, dass Pferde- sowie Esel-DNA in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 0,1 % nachweisbar ist.

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

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen (z.B. 99,9 % Pferd und 0,1 % Esel) zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen.

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°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 mit drei Detektionskanälen (522 nm, 553 nm und 670 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler/MIC/LightCycler® 480	Rotorgene
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 35 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 35 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase Nachweissystem Pferd: Diverse Geräte FAM -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Nachweissystem Wirbeltier und interne Amplifikationskontrolle (IAAC): Diverse Geräte VIC/HEX -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Nachweissystem Esel: Diverse Geräte Cy5 -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 618 nm - 660 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

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 und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen 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
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix im Vortex 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 Analysen-Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Pferd und im Cy5-Kanal der Parameter Esel detektiert. Im VIC-Kanal wird ein möglicher tierischer DNA-Anteil in der Probe nachgewiesen. Ist keine tierische DNA in der Probe vorhanden, wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter (Pferd/Esel) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (Pferd/Esel) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (VIC-Kanal) **positiv** ist (siehe dazu auch Tabelle unten).

Ergebnis im jeweiligen Kanal			Ergebnis
FAM-Kanal Pferd	VIC/HEX - Kanal ¹ Tier + IAC	Cy5-Kanal Esel	
positiv	positiv	negativ	Pferd-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	Wirbeltier-DNA² nachweisbar
negativ	positiv	positiv	Esel-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar ³

¹ Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im VIC-Kanal deutlich vor dem Signal der internen Amplifikationskontrolle (erkennbar in der Negativkontrolle ohne DNA-Zugabe) wird das generelle Vorhandensein von tierischer DNA in der Probe nachgewiesen.

² Zeigt das interne Signal (VIC) einen Cp-Wert im Bereich der Negativkontrolle (ohne DNA Zugabe), dann wird die PCR zwar nicht inhibiert, jedoch liegt entweder gar keine oder sehr wenig tierische DNA vor.

³ Sollte eine Probe in allen Kanälen inklusive dem VIC-Kanal **negativ** sein, sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

Hinweis: Bei Anwesenheit von DNA aus mehr als einer Tierart kann das Mischungsverhältnis der DNAs einen kompetitiven Einfluss auf die Intensität der absoluten Fluoreszenz haben. Je geringer der relative Gehalt der zu bestimmenden DNA in einem Gemisch tierischer DNAs ist, desto geringer ist das Fluoreszenzniveau der Amplifikationskurve.

Januar 2019

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- 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

The test detects horse DNA (*Equus caballus*) and donkey DNA (*Equus asinus*) separately. Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for vertebrates DNA (IAAC). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of three fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm and 670 nm. The technical validation of instruments was performed on Roche Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, BMS MIC, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ANIMAL ID 3plex Horse/Donkey+IAAC real-time PCR is developed for the detection of horse- and donkey-DNA in muscle meat mixtures at a relative amount of ≥ 0.1 %. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

Note: In mixed samples, inconsistent mixing ratios (e.g. 99.9 % horse and 0.1 % donkey) may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation 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 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	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 with three detection channels (522 nm, 553 nm and 670 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps) pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

	Blockcycler/MIC/LightCycler® 480 II	Rotorgene
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 35 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 35 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase Detection System water horse: Various devices FAM -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm Detection System vertebrates and internal amplification control (IAAC): Various devices VIC/HEX -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm Detection System donkey: Various devices Cy5 -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 618 nm - 660 nm	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

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 and extraction control. The master-mix includes an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

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. 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 for 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 tube of 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.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells 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 results of the control reactions have to be correct.

Horse DNA is detected in the FAM-channel and donkey DNA is detected in the Cy5-channel. In the VIC-channel it is possible to detect animal DNA in the sample as well as the amplification control (IAC) in a sample with no animal DNA inside.

A sample is stated **positive** for the respective parameter (horse/donkey), if the sample DNA shows amplification in the respective channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter (horse/donkey), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the internal signal (VIC-channel) of the sample is **positive** (see also table below).

result in the respective channel			
FAM - channel horse	VIC/HEX - channel ¹ animal + IAC	Cy5 - channel donkey	result
positive	positive	negative	horse DNA detected
negative	positive	negative	vertebrates DNA² detected
negative	positive	positive	donkey DNA detected
negative	negative	negative	invalid ³

¹ If the signal of the internal control (VIC-channel) of the sample DNA is detected significantly before the signal of the negative control (master-mix without DNA) the sample contains animal DNA.

² Is the Cp-value of the internal control (VIC-channel) in the range of the negative control the sample contains no PCR-inhibiting substances but only a low amount or no animal DNA.

³ In the case of a negative result in all channels including the VIC-channel the sample contains PCR inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

Note: If the sample contains more than one animal species the DNA mixture can have a competitive influence on the absolute fluorescence. The lower the concentration of the determinant DNA is in a mixture of animal DNAs the lower is the fluorescence level of the amplification curve.

January 2019

3 Further Information

3.1 Product Information

- 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

