

SureFood[®] FISH ID 3plex Halibut IAAC (R&D Version)

Art. No. S6201

50 rxn

User Manual



 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.6	Geräteeinstellungen	4
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	7
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	7
3.2	Technischer Support	7
3.3	Vertrieb und Bestellung	7

 **Content**

1	General Information	8
1.1	Description	8
1.2	Limit of Detection	8
1.3	DNA-preparation	8
1.4	Kit components and storage	9
1.5	Additionally required equipment and materials	9
1.6	Setup	9
1.7	Detection channel Set-up	10
2	Qualitative Analysis	11
2.1	Protocol	11
2.1.1	Preparation of the master-mix	11
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	11
2.2	Interpretation of results	12
3	Further Information	12
3.1	Product Information	12
3.2	Technical Support	12
3.3	Distribution and Ordering	12

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird DNA des Weißen Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*) und DNA des Schwarzen Heilbutt (*Reinhardtius hippoglossoides*) nachgewiesen und differenziert. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA (IAAC) ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm und 670 nm detektieren können, verwendet werden.

Das Nachweisverfahren für Weißen Heilbutt weist eine Querempfindlichkeit zu Alaska-Heilbutt (*Hippoglossus stenolepsis*) auf.

Das Nachweisverfahren für Schwarzen Heilbutt weist eine Querempfindlichkeit zu Buttermakrele (*Lepidocybium flavobrunneum*) auf.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® FISH ID 3plex Halibut IAAC (R&D Version) real-time PCR ist so ausgelegt, dass die DNA des Weißen und Schwarzen Heilbutt in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 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 % Weißer Heilbutt und 0,1 % Schwarzer Heilbutt) 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	1 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 10 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 100 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 / R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler / LTF MyGo Pro
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 35
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 Mx3005P	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Agilent AriaDx	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAAC	VIC	None	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	+	
	IAAC	VIC	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	465-510	+	
	IAAC	533-580	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	618-660		
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	465-510	+	
	IAAC	540-580	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	610-670	+	

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 *Hippoglossus hippoglossus* oder *Reinhardtius hippoglossoides* - 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.

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 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.

Im FAM-Kanal wird der Parameter *Hippoglossus hippoglossus* und im Cy5-Kanal wird der Parameter *Reinhardtius hippoglossoides* 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 detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für die Parameter *Hippoglossus hippoglossus* oder *Reinhardtius hippoglossoides* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter *Hippoglossus hippoglossus* oder *Reinhardtius hippoglossoides* bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC-Kanal) **positiv** ist.

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.

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.

Sollte die Probe im FAM-Nachweissystem **negativ** sein und auch das Signal in der internen VIC-Kontrolle **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.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- 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 White (*Hippoglossus hippoglossus*) and Black Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) DNA. 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 two fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm and 670 nm at the same time.

Cross reactivity was observed in the white halibut detection system with DNA extracts from *Hippoglossus stenolepis*.

Cross reactivity was observed in the black halibut detection system with DNA extracts from *Lepidocybium flavobrunneum*.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® FISH ID 3plex Halibut IAAC (R&D Version) real-time PCR is developed for the detection of White and Black Halibut in muscle meat mixture at a relative amount of 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 % White Halibut and 0.1 % Black Halibut) 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	1 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 10 µl	Red
3	Positive Control	1 x 100 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, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered 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)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	35	35
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 Mx3005P	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Agilent AriaDx	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAAC	VIC	None	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	FAM	+	
	IAAC	VIC	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Cy5	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	465-510	+	
	IAAC	533-580	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	465-510	+	
	IAAC	540-580	+	
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	610-670	+	

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 White and Black Halibut detection:

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.

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
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 need to give the correct results.

The White Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) DNA is detected in the FAM-channel and the Black Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) 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 in a sample with no animal DNA inside.

A sample is stated **positive** for *Hippoglossus hippoglossus* or *Reinhardtius hippoglossoides*, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for *Hippoglossus hippoglossus* or *Reinhardtius hippoglossoides*, if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal control (VIC-channel) of the sample is positive.

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

If the sample DNA and the internal signal are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples 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.

3 Further Information

3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- 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

