

**CONGEN**

# **SureFood<sup>®</sup> ANIMAL QUANT Equus**

Art. No. S1016  
2 x 50 rxn

## **User Manual**



**November 2019**

 **Inhalt**

1	Allgemeines .....	3
1.1	Beschreibung .....	3
1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....	3
1.3	DNA-Präparation .....	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung .....	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	3
1.6	Geräteeinstellungen .....	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen .....	4
2	Quantitative Analyse .....	5
2.1	Protokoll .....	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix .....	5
2.1.2	Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen .....	5
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	6
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 and Limit of Quantification .....	8
1.3	DNA-preparation .....	8
1.4	Kit components and storage .....	8
1.5	Additionally required equipment and materials .....	8
1.6	Setup.....	9
1.7	Detection channel Set-up .....	9
2	Qualitative Analysis .....	10
2.1	Protocol .....	10
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	10
2.1.2	Preparation of the standard DNA dilutions .....	10
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix .....	11
2.2	Interpretation of results .....	11
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**

SureFood® ANIMAL QUANT Equus ist eine real-time PCR zur relativen quantitativen Bestimmung des Equiden-DNA Anteils relativ zum Gesamttier (Amnioten)-DNA Anteil in Fleischwaren. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis eines equidenspezifischen Gens (Equus-Nachweisgen) und ein real-time PCR-System für den Nachweis eines tierischen Gens (Referenzgen) verwendet.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II und Qiagen Rotor-Gene Q.

### **1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die equidenspezifische spezifische real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  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.

Die Bestimmungsgrenze für die equidenspezifische PCR ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für Equiden bei 0,1 %.

### **1.3 DNA-Präparation**

Für die DNA-Präparation von Fleischwaren wird das SureFood® PREP Basic Kit empfohlen.

### **1.4 Kit-Inhalt und Lagerung**

<b>Kit Code</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>	<b>Deckelfarbe</b>
1	Reference Reaction Mix	2 x 500 µl	Orange
2	Equus Reaction Mix	2 x 500 µl	Gelb
3	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	Weiß
5	Standard DNA	1 x 45 µl	Dunkelblau
6	Positive Control (100% Pferd)	1 x 80 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 Art. Nr. S1052)
- 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**

	<b>Blockcycler &amp; R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcycler &amp; LTF MyGo Pro</b>
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**

<b>Real-time PCR Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektions- kanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	Equiden	FAM	+	
	Referenz	FAM	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Equiden	FAM	+	
	Referenz	FAM	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Equiden	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	Referenz	FAM	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Equiden	FAM	+	
	Referenz	FAM	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	Equiden	green	+	
	Referenz	green	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	Equiden	FAM	+	
	Referenz	FAM	+	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	Equiden	green	+	
	Referenz	green	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Equiden	465-510	+	
	Referenz	465-510	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Equiden	465-510	+	
	Referenz	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 Referenz-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 Equiden-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.

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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

#### 2.1.2 Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Referenzgen- (**Reference**) und der Nachweisgen- (**Equus**) 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 <sup>#</sup>
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

<sup>#</sup> **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.

## 2.1.3 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 und der Standard Verdünnungen 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 wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Reference**, **Equus**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisen (**Equus**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Referenzgen (**Reference**) wiederholt. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient  $R^2 > 0,98$  sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

Aus den berechneten Kopienzahlen für die untersuchte Probe und der Positive Control wird das Verhältnis von Equiden-Nachweisen (**Equus**) zum Tier-Referenzgen (**Reference**) ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

Probe <b>Equus</b>	1.350 Kopien	Positive Control <b>Equus</b>	900 Kopien
Probe <b>Reference</b>	45.000 Kopien	Positive Control <b>Reference</b>	1.100 Kopien

Zur Berechnung des prozentualen Anteils ist die Nachweisen Kopienzahl durch die Referenzgen Kopienzahl zu dividieren und mit einhundert zu multiplizieren.

**Equiden DNA-Anteil = Equus Kopienzahl \* 100 / Reference Kopienzahl**

Proben-DNA **Equiden** Anteil =  $1.350 * 100 / 45.000$       Proben-DNA **Equiden** Anteil = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **Equiden** DNA-Anteil von 3,0 % und nach derselben Berechnung ein Wert von 81,8 % für die Positive Control.

Zur Berechnung des endgültigen Wertes für die Probe, wird ein Korrekturfaktor (K) eingeführt, der Lauf-zu-Lauf-Schwankungen bereinigt. Dabei wird der im Lauf berechnete Wert für die Positive Control mit dem wahren Wert der Positive Control zu einem Korrekturfaktor K berechnet. Der wahre Wert der Positive Control beträgt 100 % **Pferd**-Anteil. K ist das Verhältnis aus diesem wahren Wert zu dem in diesem Lauf bestimmten Wert.

$K = \text{wahrer Wert} / \text{bestimmter Wert}$        $K (\text{Beispiel}) = 100 \% / 81,8 \% = 1,2$

Der berechnete DNA-Anteil der Probe ist das Produkt aus dem in diesem Lauf bestimmten Anteil und K.

$\text{DNA-Anteil Probe} = \text{bestimmter DNA-Anteil Probe} * K$        $\text{Probe (Beispiel)} = 3,0 \% * 1,2 = 3,6 \%$

Somit errechnet sich ein **Equiden DNA-Anteil von 3,6 %** für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

**Hinweis:** Innereien, insbesondere Niere und Leber, weisen pro Gewichtsanteil aufgrund einer höheren Zellzahl einen entsprechend höheren DNA-Anteil als Muskelfleisch auf. Dies kann bei der Berechnung des prozentualen Spezies-Anteils zu einer „Über“quantifizierung des Tieres, aus dem die Innereien stammen, führen. Bei Fleischprodukten mit Innereianteilen  $> 5 \%$  ist daher Vorsicht bei der Angabe der Speziesanteile geboten.

### **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](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Validierungsdaten 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](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

**r-biopharm®**





## 1 General Information

### 1.1 Description

The SureFood® ANIMAL QUANT Equus real-time PCR detects the relative equine DNA amount to the total animal (amnions) DNA content in meat samples. Therefore the kit contains two PCR systems, one for detection of an equine specific gene (**Equus** detection gene) and one for the detection of an animal gene (**Reference** gene).

The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The technical validation of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II and Qiagen Rotor-Gene Q

### 1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The equine specific PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  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.

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 equine DNA is 0.1 %.

### 1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of meat samples the use of SureFood® PREP Basic is recommended.

### 1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reference Reaction Mix	2 x 500 $\mu$ l	Orange
2	Equus Reaction Mix	2 x 500 $\mu$ l	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 11 $\mu$ l	Red
4	Dilution Buffer	1 x 1300 $\mu$ l	White
5	Standard DNA	1 x 45 $\mu$ l	Dark Blue
6	Positive Control (100% horse)	1 x 80 $\mu$ l	Light Blue

**Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light.**

### 1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFood® PREP Basic Art. No. S1052)
- 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<sup>®</sup> ANIMAL QUANT Equus (2 x 50 rxn)

Art. No. S1016

November 2019

## 1.6 Setup

	<b>Blockcycler &amp; R-Biopharm RIDA<sup>®</sup>CYCLER</b>	<b>Rotorcycler &amp; LTF MyGo Pro</b>
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
<b>Agilent Mx3005P</b>	Equidae	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Equidae	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Equidae	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	Reference	FAM	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Equidae	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
<b>R-Biopharm RIDA<sup>®</sup>CYCLER</b>	Equidae	green	+	
	Reference	green	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	Equidae	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Equidae	green	+	
	Reference	green	+	
<b>Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 II</b>	Equidae	465-510	+	
	Reference	465-510	+	
<b>Roche cobas<sup>®</sup> z 480 Analyzer</b>	Equidae	465-510	+	
	Reference	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 reference 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 equidae 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.

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 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
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**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 (**Reference**) and the detection gene (**Equus**). 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 or capillaries 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 (**Reference, Equus**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**Equus**) 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 (**Reference**). 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 **Reference** and **Equus** the relative equine content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

Sample <b>Equus</b>	1,350 copies	Positive Control <b>Equus</b>	900 copies
Sample <b>Reference</b>	45,000 copies	Positive Control <b>Reference</b>	1,100 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.

**equine** DNA content = **Equus** copy number \* 100 / **Reference** copy number

sample **equine** DNA content = 1,350 \* 100 / 45,000      sample **equine** DNA content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **equine** DNA content of 3.0 %, for the sample and 81.8 % 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 (100 % **equine** content) and the measured percentage of the Positive Control.

$K = \text{true value} / \text{measured value}$        $K \text{ (example)} = 100 \% / 81.8 \% = 1.2$

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 % \* 1.2 = 3.6 %

For that example the **equine DNA content is 3.6 %**.

**Note:** Innards, particularly kidney or liver, show a higher DNA content per weight unit when compared to muscle tissue. This could lead to over-estimation of the species content of the animal from which the innards come from. For meat products with innards content >5 % care has to be taken when relative species contents are reported.

### **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](http://www.congen.de/en/company/downloads))
- Validation Report upon request

#### **3.2 Technical Support**

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to [sales@r-biopharm.de](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

r-biopharm®

