

**CONGEN**

**SureFast<sup>®</sup> Animal+Plant  
Control 3plex**

Art. No. F4053

100 rxn

**User Manual**



**April 2018**

** Inhalt /  Content**

1.	Allgemeines.....	2
1.1	Beschreibung.....	2
1.2	Nachweisgrenze.....	2
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung .....	2
1.4	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	2
1.5	Geräteeinstellungen .....	3
2	Qualitative Analyse .....	3
2.1	Protokoll .....	3
2.1.1	DNA-Präparation.....	3
2.1.2	Herstellen des Master-Mix .....	3
2.1.3	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
1	General Information.....	6
1.1	Description .....	6
1.2	Limit of Detection .....	6
1.3	Kit components and storage .....	6
1.4	Additionally required equipment and materials .....	6
1.5	Setup.....	7
2	Qualitative Analysis .....	7
2.1	Protocol .....	7
2.1.1	DNA-Preparation.....	7
2.1.2	Preparation of the master-mix .....	7
2.1.3	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

## 1. Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

Die SureFast® Animal+Plant Control 3plex real time PCR dient der Funktionsüberprüfung der DNA-Extraktion mit gleichzeitiger Differenzierung zwischen Wirbeltier- und Pflanzen-DNA. Der Test ist mit einer Internal Control DNA (ICD) ausgestattet, die gleichzeitig als Extraktions- und interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann.

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/HEX und Cy5) detektieren können, verwendet werden. Die Technische Gerätevalidierung wurde auf dem Roche LightCycler® 480 II/Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, BMS MIC, Agilent Mx3005P und Agilent AriaDx durchgeführt.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Animal+Plant Control 3plex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 500$  DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

### 1.3 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
D	Internal Control DNA	2 x 1800 µl	Orange
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern.

### 1.4 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

**1.5 Geräteeinstellungen**

	<b>Blockcycler/MIC/LightCycler® 480</b>	<b>Rotor-Gene</b>
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
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase  Nachweissystem Pflanze: Diverse Geräte <b>FAM</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Nachweissystem Internal Control DNA (ICD): Diverse Geräte <b>VIC/HEX</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm  Nachweissystem Wirbeltier: Diverse Geräte <b>Cy5</b> -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: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

**2 Qualitative Analyse**

**2.1 Protokoll**

**2.1.1 DNA-Präparation**

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Basic und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit empfohlen.

Dieser Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die entweder als interne Amplifikationskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die ICD als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden.

Wird die ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD soll dem Proben-Lysisbuffer Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

**2.1.2 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 Blank der Extraktion. Dieser Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), die als Extraktions- bzw. Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

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

April 2018

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der **ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle:**

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 im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der **ICD als interne Inhibitionskontrolle:**

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Internal Control DNA	1,0 µl	11,0 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>21 µl</b>	<b>231 µl</b>

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

### 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 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.

Mit diesem sehr sensitiven Nachweis werden auch minimale Verunreinigungen durch die Ziel-DNA erfasst (z.B. Pollenflug, humane DNA durch den Bearbeiter). Dies kann zu positiven Signalen der Negativkontrollen führen. Erfahrungsgemäß liegt dann der Cp-Wert der Negativkontrollen bei > 33. Die Positivkontrolle muss einen deutlich früheren Cp-Wert aufweisen (ca. Cp 17-20).

Im FAM-Kanal wird der Parameter Pflanze und im Cy5-Kanal der Parameter Wirbeltier detektiert. Die interne Amplifikationskontrolle beziehungsweise die Extraktionskontrolle wird im VIC-Kanal nachgewiesen.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter (Pflanze/Wirbeltier) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (Pflanze/Wirbeltier) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige ICD (VIC-Kanal) **positiv** ist.

Eine Probe, die **negativ** für alle Parameter und **negativ** im VIC/HEX-Kanal (ICD) ist, kann nicht bewertet werden. In diesem Fall sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden oder die Nukleinsäure-Extraktion hat nicht ordnungsgemäß funktioniert. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden (siehe dazu auch Tabelle unten).

April 2018

Ergebnis im jeweiligen Kanal			
FAM-Kanal Pflanze	VIC/HEX ICD	Cy5-Kanal Wirbeltier	Ergebnis
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	<b>Pflanzen-DNA nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>Wirbeltier-DNA nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

**Hinweis:** Da die SureFast® Animal+Plant Control 3plex real-time PCR Wirbeltier-DNA erfasst, wird auch humane DNA (*Homo sapiens*) nachgewiesen.

### 3 Weitere Informationen

#### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

#### 3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung und Auswertung bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

## 1 General Information

### 1.1 Description

The SureFast® Animal+Plant Control 3plex real time PCR controls the DNA-preparation. In addition a differentiation between the DNA of vertebrates and plants is possible. The test contains an Internal Control DNA (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and to determine possible PCR-inhibition.

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 (FAM, VIC/HEX and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II/Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, BMS MIC, Agilent Mx3005P and Agilent AriaDx.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFast® Animal+Plant Control 3plex real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 500$  DNA copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

### 1.3 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 $\mu$ l	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 $\mu$ l	Red
D	Internal Control DNA	2 x 1800 $\mu$ l	Orange
3	Positive Control	1 x 200 $\mu$ l	Light Blue

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

### 1.4 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

**1.5 Setup**

	<b>Blockcycler/MIC/LightCycler® 480 II</b>	<b>Rotor-Gene</b>
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
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase  Detection System Plant: Various devices <b>FAM</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Detection System Internal Control DNA (ICD): Various devices <b>VIC/HEX</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm  Detection System Vertebrates: Various devices <b>Cy5</b> -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: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

**2 Qualitative Analysis**

**2.1 Protocol**

**2.1.1 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.

The test assay contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as a PCR inhibition control.

If the ICD is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the ICD should be added to the Master-Mix.

If the ICD is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the ICD should be added during extraction procedure. The ICD should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must not be added directly to the specimen.

**2.1.2 Preparation of the master-mix**

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control and blank of extraction. The test assay contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as extraction control.

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.



April 2018

Example for the calculation and preparation of 10 reactions for **ICD as extraction and PCR inhibition control**:

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

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions for **ICD only as PCR inhibition control**:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Internal Control RNA	1.0 µl	11.0 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>21 µl</b>	<b>231 µl</b>

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

### 2.1.3 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.

With this sensitive real-time PCR kit it is possible to detect minimal contaminations by the target DNA (for example airborne pollen, human DNA from the operator). These can lead to positive signals of the negative controls. Experience has shown that in this case the negative control has a Cp-value of > 33. The positive control should have a Cp-value around Cp 17-20.

Plant DNA is detected in the FAM-channel and vertebrates DNA is detected in the Cy5-channel. The internal amplification/extraction control will be detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive** for the respective parameter (plant/vertebrates), if the sample DNA shows amplification in the respective channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter (plant/vertebrates), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the ICD signal (VIC-channel) of the sample is **positive**.

If the sample DNA and the internal control DNA are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances or the sample preparation was not successful. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved (see also table below).

April 2018

result in the respective channel			
FAM-channel plant	VIC/HEX-channel ICD	Cy5 - channel vertebrates	result
<b>positive</b>	<b>positive</b>	negative	<b>plant DNA detected</b>
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>vertebrates DNA detected</b>
negative	negative	negative	invalid

**Note:** The SureFast® Animal+Plant Control 3plex real-time PCR detects DNA of vertebrates. That's the reason for the detection of human DNA (*Homo sapiens*).

### 3 Further Information

#### 3.1 Product Information

- Validation Report

#### 3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).