

CONGEN

SureFast[®] Animal+Plant Control 3plex

Art. No. F4053
100 rxn

User Manual



November 2023

Inhalt

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.4	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.5	Geräteeinstellungen	5
1.6	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitative Analyse	6
2.1	Protokoll	6
2.1.1	DNA-Präparation	6
2.1.2	Herstellen des Master-Mix	6
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	8
3	Weitere Informationen	9
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	9
3.2	Technischer Support	9



Content

1	General Information	10
1.1	Description	10
1.2	Limit of Detection	10
1.3	Kit components and storage	11
1.4	Additionally required equipment and materials	11
1.5	Setup	12
1.6	Detection channel Set-up	12
2	Qualitative Analysis	13
2.1	Protocol	13
2.1.1	DNA-preparation	13
2.1.2	Preparation of the master-mix	13
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix	14
2.2	Interpretation of results	15
3	Further Information	16
3.1	Product Information	16
3.2	Technical Support	16

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 in Lebensmitteln.

Der Test ist mit einer Internal Control DNA (ICD) ausgestattet, die gleichzeitig als Extraktions- und interne Amplifikationskontrolle verwendet werden kann. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens drei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, Bio-Rad CFX96Opus, Agilent AriaDx, sowie am R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® Animal+Plant Control 3plex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 500 DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von der Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und dem DNA-Gehalt.

Die SureFast® 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.

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen* zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert vor 20 erreicht wird.

* z.B. 95 % Wirbeltier und 5 % Pflanzen

1.3 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
D	Internal Control DNA	2 x 1800 µl	Orange
3	Positive Control	1 x 190 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°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.

1.4 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit
(z.B. SureFood® PREP Basic Art. Nr. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053 / SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060 / SureFood® PREP Add On Art. Nr. S1055)
- Real-time PCR Gerät mit drei Detektionskanälen (510 nm, 580 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.5 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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

1.6 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaMx /Dx	Pflanze	FAM	+	
	ICD	HEX	+	
	Wirbeltier	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96 /Dx/Opus	Pflanze	FAM	+	
	ICD	VIC/HEX	+	
	Wirbeltier	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Pflanze	green	+	
	ICD	yellow	+	
	Wirbeltier	red	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Pflanze	green	+	Achtung: Nur 0.1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werks- einstellung) eingestellt sein.
	ICD	yellow	+	
	Wirbeltier	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Pflanze	465-510	+	
	ICD	533-580	+	
	Wirbeltier	618-660	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 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.

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 (siehe Tabelle 2.1.2).

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: Negativkontrolle, negative Extraktionskontrolle und Positivkontrolle.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Pflanzen- und Wirbeltier-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 bei Verwendung der ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle:

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.

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	19,3 µl	212,3 µl
ICD	1,0 µl	11,0 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	21 µl	231 µl

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

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

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 (siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (ICD) detektiert.

Eine Probe wird als **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle bzw. positive Extraktionskontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **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 Pflanze oder Wirbeltier mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal			Interpretation
FAM-Kanal Pflanze	Cy5-Kanal Wirbeltier	VIC/HEX-Kanal ICD	
positiv	negativ	positiv/negativ	Pflanzen-DNA nachweisbar
negativ	positiv	positiv/negativ	Wirbeltier -DNA nachweisbar
positiv	positiv	positiv/negativ	Pflanzen und Wirbeltier -DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	Keine Ziel DNA nachweisbar
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

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Verifizierungsdaten auf Anfrage

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an 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 in food.

Each reaction contains an Internal Control DNA (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and to monitor possible PCR-inhibition. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of three fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX and Cy5 at the same time. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, Bio-Rad CFX96 Opus, Agilent AriaDx, and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® Animal+Plant Control 3plex real-time PCR has a limit of detection of ≤ 500 DNA copies.

The limit of detection of the complete method (DNA extraction and real-time PCR) depends on sample matrix, processing grade, DNA-preparation and DNA-content.

The SureFast® 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.

Note: Inconsistent mixing ratios* may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (C_p value < 20).

* e.g. 95 % vertebrates and 5 % plant

1.3 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
D	Internal Control DNA	2 x 1800 µl	Orange
3	Positive Control	1 x 190 µl	Light Blue

Store all reagents at –20°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.

1.4 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit
(E.g. SureFood® PREP Basic Art. No. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053 / SureFast® Mag PREP Food Art. No. F1060/ SureFood® PREP Add On Art. No. S1055)
- real-time PCR instrument with three detection channels (510 nm, 580 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.5 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 35
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

1.6 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaMx / Dx	Plant	FAM	+	
	ICD	HEX	+	
	Vertebrates	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96 / Dx/ Opus	Plant	FAM	+	
	ICD	VIC/HEX	+	
	Vertebrates	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Plant	green	+	
	ICD	yellow	+	
	Vertebrates	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Plant	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	ICD	yellow	+	
	Vertebrates	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Plant	465-510	+	
	ICD	533-580	+	
	Vertebrates	618-660	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 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.

The test assay contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as positive 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 per reaction of the ICD should be added to the master-mix (see point 2.1.2).

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 pipetted to the sample with added Lysis Buffer and must not be added directly to the raw sample.

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay as well as for the inhibition control.

2.1.2 Preparation of the master-mix

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, negative extraction control, positive control.

Reactions needed for the qualitative detection of plant and vertebrates:

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.

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 using ICD as positive extraction control and PCR inhibition control.

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.

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

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
ICD	1.0 µl	11.0 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	21 µl	231 µl

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.
- 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 have to show the correct results.

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. In the VIC/HEX-channel the amplification or positive extraction control (ICD) is detected. (see also table below)

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the amplification or positive extraction control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the negative control.

If the sample DNA in the VIC/HEX-channel 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 plant or vertebrates PCR assay.

result in the respective channel			Interpretation
FAM channel plant	Cy5 channel vertebrates	VIC/HEX channel ICD	
positive	negative	positive/negative	plant DNA detected
negative	positive	positive/negative	vertebrates DNA detected
positive	positive	positive/negative	plant and vertebrates DNA detected
negative	negative	positive	no target DNA detected
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

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

3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.