

**CONGEN**

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

Art. No. S6119  
100 rxn

## **User Manual**



**January 2024**

 **Inhalt**

1	Allgemeines .....	3
1.1	Beschreibung .....	3
1.2	Nachweisgrenze .....	3
1.3	DNA-Präparation .....	4
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 .....	8
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	8
3.2	Technischer Support .....	8
3.3	Vertrieb und Bestellung .....	8



## **Content**

1	General Information .....	9
1.1	Description .....	9
1.2	Limit of Detection .....	9
1.3	DNA-preparation .....	10
1.4	Kit components and storage .....	10
1.5	Additionally required equipment and materials .....	10
1.6	Setup.....	10
1.7	Detection channel Set-up .....	11
2	Qualitative Analysis .....	12
2.1	Protocol .....	12
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	12
2.2	Interpretation of results .....	13
3	Further Information .....	14
3.1	Product Information.....	14
3.2	Technical Support .....	14
3.3	Distribution and Ordering .....	14

## 1 Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

SureFood® ANIMAL ID 3plex Horse/Donkey+IAAC ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von Pferd (*Equus caballus*) und Esel (*Equus asinus*).

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA ausgestattet (IAAC). 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 Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, Bio Molecular Systems MIC, Bio-Rad CFX96, Roche cobas® z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 480 II und Qiagen Rotor-Gene Q.

### 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 (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von der Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und dem 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.

**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-Verteilung erreicht wird.

\* z.B. 99,9 % Pferd und 0,1 % Esel

# SureFood® ANIMAL ID 3plex Horse/Donkey+IAAC (100 rxn)

Art. Nr. S6119

Januar 2024

## 1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052) und für stark prozessierte Proben wird der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053) empfohlen.

## 1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1050 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 Art. Nr. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053)
- 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

## 1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
<b>Agilent Mx3005P</b>	Pferd	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	Esel	Cy5	+	
<b>Agilent AriaMx / Dx</b>	Pferd	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	Esel	Cy5	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Pferd	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAAC	VIC	None	
	Esel	Cy5	None	
<b>Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus</b>	Pferd	FAM	+	
	IAAC	VIC/HEX	+	
	Esel	Cy5	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	Pferd	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	Esel	red	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Pferd	green	+	<b>Achtung:</b> Nur 0.1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAAC	yellow	+	
	Esel	red	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Pferd	465-510	+	
	IAAC	533-580	+	
	Esel	618-660	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Pferd	465-510	+	
	IAAC	540-580	+	
	Esel	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 Pferd- und Esel-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.

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 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.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Pferd und im Cy5-Kanal der Parameter Esel detektiert (siehe Tabelle). Im VIC/HEX-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 als **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Die interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) muss im VIC/HEX-Kanal **positiv** mit einer Cp-Abweichung  $\leq 2$  zur Negativkontrolle sein.

Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal deutlich vor dem Signal der internen Amplifikationskontrolle (erkennbar an der Negativkontrolle) wird das generelle Vorhandensein von tierischer DNA in der Probe als **positiv** nachgewiesen (siehe Tabelle).

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

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 Pferd oder mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal			Interpretation
FAM-Kanal Pferd	Cy5-Kanal Esel	VIC/HEX-Kanal Tier + IAC	
<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	Pferd-DNA nachweisbar
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	Esel-DNA nachweisbar
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	Pferd- und Esel-DNA nachweisbar
negativ	negativ	<b>positiv, Cp &lt; Negativ- kontrolle</b>	Wirbeltier-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

**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](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Verifizierungsdaten 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 ID 3plex Horse/Donkey+IAAC is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific horse (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) DNA sequences.

Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for vertebrates DNA (IAAC). If the DNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. 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 Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, Bio Molecular Systems MIC, Bio-Rad CFX96, Roche cobas® z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 480 II and Qiagen Rotor-Gene Q.

### **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 mixture at a relative amount of 0.1 %.

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 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.

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

\* e.g. 99.9 horse and 0.1 % donkey

# SureFood® ANIMAL ID 3plex Horse/Donkey+IAAC (100 rxn)

Art. No. S6119

January 2024

## 1.3 DNA preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052) and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053) is recommended.

## 1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 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 Art. No. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053)
- 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

## 1.6 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
<b>Agilent Mx3005P</b>	horse	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	donkey	Cy5	+	
<b>Agilent AriaMx / Dx</b>	horse	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	donkey	Cy5	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	horse	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAAC	VIC	None	
	donkey	Cy5	None	
<b>Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus</b>	horse	FAM	+	
	IAAC	VIC/HEX	+	
	donkey	Cy5	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	horse	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	donkey	red	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	horse	green	+	<b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	IAAC	yellow	+	
	donkey	red	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	horse	465-510	+	
	IAAC	533-580	+	
	donkey	618-660	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	horse	465-510	+	
	IAAC	540-580	+	
	donkey	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 detection of horse and donkey:

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:

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 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.

Horse DNA is detected in the FAM-channel and donkey DNA is detected in the Cy5-channel. In the VIC/HEX-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. (see also table below)

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel. The internal amplification control (inhibition control) of the sample has to be **positive** with a shift in Cp-Value  $\leq 2$  compared to the negative control in the VIC/HEX-channel.

If the internal control signal in the VIC/HEX-channel of the sample DNA is detected significantly before the signal of the negative control the sample is stated **positive** for animal DNA.

Is the Cp-value of the internal control in the VIC/HEX-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 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 horse or donkey PCR assay.

result in the respective channel			Interpretation
FAM channel horse	Cy5 channel donkey	VIC/HEX channel animal + IAC	
<b>positive</b>	negative	<b>positive</b>	horse DNA detected
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	donkey DNA detected
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	Horse and donkey DNA detected
negative	negative	<b>positive, Cp &lt; negative control</b>	vertebrates DNA detected
negative	negative	negative	invalid

**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](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)

