

CONGEN

SureFood® ANIMAL ID
Pork SENS PLUS

Art. No. S6017
100 rxn

User Manual



June 2022

 **Inhalt**

| | | |
|-------|--|---|
| 1 | Allgemeines | 3 |
| 1.1 | Beschreibung | 3 |
| 1.2 | Nachweis- und Bestimmungsgrenze | 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 and Limit of Quantification | 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 Pork SENS PLUS ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz von Schwein (*Sus scrofa*).

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet (IAC). 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 zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS real-time PCR ist so ausgelegt, dass Schwein-DNA in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von $\leq 0,0001\%$ nachweisbar ist.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit ist das Verfahren für die Analyse hoch prozessierter Produkte wie z.B. Gelatine, Süßigkeiten oder Tiermehl geeignet.

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.

SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS (100 rxn)

Art. Nr. S6017

Juni 2022

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 1100 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 zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 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 & LTF MyGo Pro |
|--|---|-------------------------------|
| Initial Denaturation (HOLD) | 5 min, 95°C | 1 min, 95°C |
| Cycles | 45 | 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 Detektionskanaleinstellungen

| Real-time PCR Gerät | Nachweis | Detektionskanal | Quencher | Bemerkung |
|------------------------------------|----------|-----------------|----------|---|
| Agilent Mx3005P | Schwein | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Agilent AriaDx | Schwein | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Applied Biosystems 7500 | Schwein | FAM | None | Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none. |
| | IAC | VIC | None | |
| Bio-Rad CFX96 / Dx | Schwein | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | Schwein | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| LTF MyGo Pro | Schwein | FAM | + | |
| | IAC | VIC | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | Schwein | green | + | Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) |
| | IAC | yellow | + | |
| Roche LightCycler® 2.0 | Schwein | 530 | None | Das SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) wird benötigt. Stellen Sie die Seek Temperature auf 58°C. |
| | IAC | 560 | None | |
| Roche LightCycler® 480 II | Schwein | 465-510 | + | |
| | IAC | 533-580 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | Schwein | 465-510 | + | |
| | IAC | 540-580 | + | |

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 Schwein-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 |
| 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 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 Schwein detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Schwein bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-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 Parameter Schwein bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (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 Schwein mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

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 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.

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

r-biopharm®



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific pork (*Sus scrofa*) DNA sequence.

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). 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 two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS real-time PCR is developed for the detection of pork DNA in muscle meat mixture at a relative amount of ≤ 0.0001 %.

Due to the high sensitivity the method is suitable for the analysis of highly processed products like e.g. gelatin, sweets or meat bone meal.

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.

SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS (100 rxn)

Art. No. S6017

June 2022

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 1100 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 two detection channels (510 nm and 580 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 & LTF MyGo Pro |
|--|---|-------------------------------|
| Initial Denaturation (HOLD) | 5 min, 95°C | 1 min, 95°C |
| Cycles | 45 | 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 |
|------------------------------------|-----------|-------------------|----------|--|
| Agilent Mx3005P | pork | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Agilent AriaDx | pork | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Applied Biosystems 7500 | pork | FAM | None | Check the passive reference option ROX is none. |
| | IAC | VIC | None | |
| Bio-Rad CFX96/Dx | pork | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | pork | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| LTF MyGo Pro | pork | FAM | + | |
| | IAC | VIC | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | pork | green | + | Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels. |
| | IAC | yellow | + | |
| Roche LightCycler® 2.0 | pork | 530 | None | The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) is required. Check the Seek Temperature is 58°C. |
| | IAC | 560 | None | |
| Roche LightCycler® 480 II | pork | 465-510 | + | |
| | IAC | 533-580 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | pork | 465-510 | + | |
| | IAC | 540-580 | + | |

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 pork:

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 |
| 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 have to show the correct results.

Pork DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for pork, if the sample DNA shows amplification in the FAM-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 pork, if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal 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 pork PCR assay.

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 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

