

**CONGEN**

# **SureFood<sup>®</sup> Oat**

Art. No. S7004

100 rxn

## **User Manual**



**Juli 2018**

July 2018

** Inhalt /  Content**

1.	Allgemeines .....	3
1.1	Beschreibung .....	3
1.2	Nachweisgrenze .....	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	Qualitative Analyse .....	5
2.1	Protokoll .....	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix .....	5
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	5
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	5
3	Weitere Informationen .....	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	6
3.2	Technischer Support .....	6
3.3	Vertrieb und Bestellung .....	6
4	General Information .....	7
4.1	Description .....	7
4.2	Limit of Detection .....	7
4.3	DNA-preparation .....	7
4.4	Kit components and storage .....	7
4.5	Detection channel Set-up .....	7
4.6	Additionally required equipment and materials .....	8
4.7	Setup .....	8
5	Qualitative Analysis .....	9
5.1	Protocol .....	9
5.1.1	Preparation of the master-mix .....	9
5.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	9
5.2	Interpretation of results .....	9
6	Further Information .....	9
6.1	Product Information .....	9

July 2018

6.2 Technical Support .....9

6.3 Distribution and ordering .....9

## 1. Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird Hafer-DNA (*Avena sativa*) qualitativ nachgewiesen. 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 bei 510 nm und 580 nm, (FAM, VIC/HEX) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q sowie am LTF MyGo Pro.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® Oat 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 DNA-Präparation

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

### 1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 $\mu$ l	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 $\mu$ l	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 $\mu$ l	Hellblau

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei  $+2$  bis  $+8^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.**

### 1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (FAM, VIC/HEX)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

## 1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler/ Bio Molecular Systems MIC	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

## 1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
<b>Agilent Mx3005P</b>	Hafer	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Hafer	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Hafer	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Hafer	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>BioMolecular Systems MIC</b>	Hafer	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	Hafer	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Hafer	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Hafer	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Hafer	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: Positivkontrolle, Negativkontrolle und eine Extraktionskontrolle. Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion. Desweiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

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

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Hinweis:** Die Taq Polymerase kann in gefrorenem und/oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder der Performance der real-time PCR.

#### 2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten, Kapillaren).
- 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 PCR Gerät einsetzen und die PCR 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. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Hafer-System zeigt. Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) **positiv** (VIC/HEX) ist. Sollte die Probe sowie die interne Amplifikationskontrolle **negativ** sein, sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

## 3 Weitere Informationen

### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

### 3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung 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)



## 4 General Information

### 4.1 Description

The test detects oat DNA (*Avena sativa*). Each reaction contains an internal amplification control. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 510 nm and 580 nm (FAM and VIC/HEX) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler· 480 II, Roche cobas· z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q and LTF MyGo Pro.

### 4.2 Limit of Detection

The SureFood® Oat 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.

### 4.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced is recommended.

### 4.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

**Store all reagents at  $-20^{\circ}\text{C}$  and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at  $+2$  to  $+8^{\circ}\text{C}$  for multiple use on the same day.**

### 4.5 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
<b>Agilent Mx3005P</b>	Oat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Oat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Oat	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Oat	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>BioMolecular Systems MIC</b>	Oat	green	+	
	IAC	yellow	+	



July 2018

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
<b>LTF MyGo Pro</b>	Oat	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Oat	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Oat	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Oat	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

#### 4.6 Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument, equipped with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, capillaries, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

#### 4.7 Setup

	<b>Blockcycler/ Bio Molecular Systems MIC</b>	<b>Rotorcycler</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

## 5 Qualitative Analysis

### 5.1 Protocol

#### 5.1.1 Preparation of the master-mix

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

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

#### 5.1.2 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 and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates or capillaries into the PCR instrument and start the run according to the setup.

#### 5.2 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 need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows an amplification signal in the oat system. A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system and the internal amplification control (inhibition control) of the sample is **positive** (VIC/HEX). If the sample DNA and the internal amplification control are **negative** the sample contains PCR inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

## 6 Further Information

### 6.1 Product Information

- Validation Report

### 6.2 Technical Support

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

### 6.3 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)

