

CONGEN

SureFood[®] Buckwheat

Art. No. S7005

100 rxn

User Manual



October 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	Additionally required equipment and materials.....	7
4.6	Setup.....	7
4.7	Detection channel Set-up.....	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.....	10
6.1	Product Information.....	10

October 2018

6.2	Technical Support	10
6.3	Distribution and ordering	10

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird Buchweizen-DNA (*Fagopyrum esculentum*) 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 LightCycler® 2.0, Roche cobas z 480 Analyzer sowie am Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® Buckwheat real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 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 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 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.

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	Rotorcyclcr
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 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	Detektions-Kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Buchweizen	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	Buchweizen	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Buchweizen	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	Buchweizen	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
BioMolecular Systems MIC	Buchweizen	green	+	
	IAC	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Buchweizen	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 2.0	Buchweizen	530-none	+	
	IAC	560-none	+	
Roche LightCycler® 480 II	Buchweizen	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Buchweizen	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
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

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 Buchweizen-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.

October 2018

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.

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



4 General Information

4.1 Description

The test detects buckwheat DNA (*Fagopyrum esculentum*). Each reaction contains an internal amplification control. 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). Also spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

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® Buckwheat real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 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°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple use on the same day.

4.5 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

4.6 Setup

	Blockcycler / Bio Molecular Systems MIC	Rotorcycler
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

4.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Buckwheat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	Buckwheat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Buckwheat	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	Buckwheat	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
BioMolecular Systems MIC	Buckwheat	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 2.0	Buckwheat	530-none	+	
	IAC	560-none	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Buckwheat	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Buckwheat	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Buckwheat	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

5 Qualitative Analysis

5.1 Protocol

5.1.1 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. 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.

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
Total volume	20 µl	220 µl

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

Note: The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8 °C for multiple use on the same day.

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 buckwheat 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.

October 2018

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.

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
www.r-biopharm.com

