

CONGEN

SureFood[®] Apricot

Art. No. S7007
100 rxn

User Manual



May 2019

 **Inhalt**

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	6
3	Weitere Informationen	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	6
3.2	Technischer Support	6
3.3	Vertrieb und Bestellung	6

 **Content**

1	General Information	7
1.1	Description	7
1.2	Limit of Detection	7
1.3	DNA-preparation	7
1.4	Kit components and storage	7
1.5	Additionally required equipment and materials	7
1.6	Setup.....	8
1.7	Detection channel Set-up	8
2	Qualitative Analysis	9
2.1	Protocol	9
2.1.1	Preparation of the master-mix	9
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	9
2.2	Interpretation of results	10
3	Further Information	10
3.1	Product Information	10
3.2	Technical Support	10
3.3	Distribution and Ordering	10

1. Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird Aprikosen-DNA (*Prunus armeniaca*) nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm und 580 nm detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent Aria Dx, Applied Biosystems 7500, BioRad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q sowie am LTF MyGo Pro.

Das Nachweisverfahren weist Querempfindlichkeiten zu Pfirsich (*Prunus persica*) mit 100 %, Pflaume (*Prunus domestica*) mit 0,9 %, zu Sauerkirsche (*Prunus cerasus*) mit 0,6 %, zu Süßkirsche (*Prunus avium*) mit 5,1 %, zu Steinweichsel/Felsenkirsche (*Prunus mahaleb*) mit 0,2 % und zu schwarzer Aprikose (*Prunus dasycarpa*) mit 100 % auf.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® Apricot 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.

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.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit
(z.B. SureFood® PREP Basic, Art. Nr. 1052 oder SureFood® PREP Advanced, Art. Nr. 1053)
- 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
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LTF MyGo Pro
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	Aprikose	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	Aprikose	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Aprikose	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
BioRad CFX96	Aprikose	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Aprikose	green	+	
	IAC	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Aprikose	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Aprikose	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Aprikose	465-510	+	
	IAC	540-580	+	
LTF MyGo Pro	Aprikose	FAM	+	
	IAC	VIC	+	

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 Aprikose -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:

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.

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 Gefäße.
- 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.

Eine Probe wird als **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt.

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

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 Aprikose mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

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

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



1 General Information

1.1 Description

The test detects apricot (*Prunus armenica*) DNA. Each reaction contains an internal amplification control. The real-time PCR assay can be used with commonly used real-time PCR instruments, equipped for the detection of two fluorescence emissions at 510 nm and 580 nm at the same time. Internal validation was performed Agilent Mx3005P, Agilent Aria Dx, Applied Biosystems 7500, BioRad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q and LTF MyGo Pro.

Cross reactivity was observed with DNA extracts from peach (*Prunus persica*) of 100 %, plum (*Prunus domestica*) of 0.9 %, from sour cherry (*Prunus cerasus*) of 0.6 %, from sweet cherry (*Prunus avium*) of 5.1 %, from mahaleb cherry (*Prunus mahaleb*) of 0.2 % and from purple apricot (*Prunus dasycarpa*) of 100 %.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® Apricot assay 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.

1.3 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.

1.4 Kit components and storage

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

Store all reagents at -20°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at $+2$ to $+8^{\circ}\text{C}$ 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.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit
(e.g. SureFood® PREP Basic, Art. No. 1052 or SureFood® PREP Advanced, Art. No. 1053)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- microcentrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

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

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Apricot	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	Apricot	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Apricot	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
BioRad CFX96	Apricot	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Apricot	green	+	
	IAC	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Apricot	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Apricot	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas z 480 Analyzer	Apricot	465-510	+	
	IAC	540-580	+	
LTF MyGo Pro	Apricot	FAM	+	
	IAC	VIC	+	

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 apricot detection:

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.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix the 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.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the FAM channel.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the FAM channel. The internal amplification control (inhibition control) of the sample has to be **positive** (VIC/HEX) 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 apricot PCR assay.

3 Further Information

3.1 Product Information

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

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

