

CONGEN

SureFast® VEGAN

Art. No. F4055
100 rxn

User Manual



April 2023

 **Inhalt**

1	Allgemeines	4
1.1	Beschreibung	4
1.2	Nachweisgrenze	4
1.3	DNA-Präparation	4
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	5
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	5
1.6	Geräteeinstellungen	6
1.7	Detektionskanaleinstellungen	6
2	Qualitative Analyse	7
2.1	Protokoll	7
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	7
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	8
3	Weitere Informationen	8
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
3.2	Technischer Support	8



Content

1	General Information	9
1.1	Description	9
1.2	Limit of Detection	9
1.3	DNA-Preparation	9
1.4	Kit components and storage	10
1.5	Additionally required equipment and materials	10
1.6	Setup.....	11
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	13
3.1	Product Information.....	13
3.2	Technical Support	13

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Die SureFast® VEGAN real time PCR ist ein sehr sensitives System zum Nachweis Wirbeltier-DNA sowie gleichzeitiger Differenzierung zwischen Wirbeltier- und Pflanzen-DNA in Lebensmitteln. Die Positive Control entspricht 0,1% Wirbeltier-DNA.

Insekten, Spinnentiere, Weichtiere und Krustentiere werden mit dem System nicht erfasst.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die gleichzeitig die Reporterfarbstoffe in den Kanälen **FAM** und **Cy5** detektieren können, verwendet werden. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, Bio-Rad CFX96 Opus, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFast® VEGAN real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von 0,01 %.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von der Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und dem DNA-Gehalt.

Die SureFast® 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

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. Nr. F1060) 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 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. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053)/
SureFast® Mag PREP Food (Art. Nr. F1060)
- Real-time PCR Gerät mit **vier** Detektionskanälen (**510 nm**, 580 nm, 610 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 30	1 min, 95°C 30
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°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 AriaMx /Dx	Pflanze	FAM	+	
	Wirbeltier	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96 /Dx/Opus	Pflanze	FAM	+	
	Wirbeltier	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Pflanze	green	+	
	Wirbeltier	red	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Pflanze	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	Wirbeltier	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Pflanze	465-510	+	
	Wirbeltier	618-660	+	

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, negative Extraktionskontrolle und Positivkontrolle.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Pflanzen- und Wirbeltier-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 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.

Mit diesem sehr sensitiven Nachweis werden auch minimale Verunreinigungen durch die Ziel-DNA erfasst (z.B. Pollenflug, humane DNA durch den Bearbeiter). Dies kann zu positiven Signalen der Negativkontrollen führen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Pflanze und im Cy5-Kanal der Parameter Wirbeltier detektiert (siehe Tabelle).

Eine Probe wird als **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt.

Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im Cy5-Kanal vor dem Signal der Positive Control, liegt die Konzentration der Probe über 0,1% Wirbeltier-DNA. Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im Cy5-Kanal nach dem Signal der Positive Control, liegt die Konzentration der Probe unter 0,1% Wirbeltier-DNA.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt.

Ergebnis im jeweiligen Kanal		Interpretation
FAM-Kanal Pflanze	Cy5-Kanal Wirbeltier	
positiv	negativ	Pflanzen-DNA nachweisbar
negativ	positiv	Wirbeltier -DNA nachweisbar
positiv	positiv	Pflanzen und Wirbeltier-DNA nachweisbar
negativ	negativ	Keine Ziel DNA nachweisbar/ nicht auswertbar

3 Weitere Informationen

3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

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

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an info@congen.de.

1 General Information

1.1 Description

The SureFast® VEGAN real time PCR is a highly sensitive system for the detection of traces of vertebrate-DNA and differentiation between DNA of vertebrates and plants in food. The Positive Control corresponds to 0.1% vertebrate-DNA.

Insects, arachnids, molluscs and crustaceans are not detected by this system.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of fluorescence emissions at the channels **FAM** and **Cy5** at the same time. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96Dx, Bio-Rad CFX96 Opus, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx.

1.2 Limit of Detection

The SureFast® VEGAN real-time PCR has a limit of detection of 0.01%.

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 SureFast® 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.

1.3 DNA-Preparation

For DNA-preparation the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. No. F1060) 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 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 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. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053)/
SureFast® Mag PREP Food (Art. No. F1060)
- real-time PCR instrument with **four** detection channels (**510 nm**, 580 nm, 610 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 30	1 min, 95°C 30
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°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 AriaMx / Dx	Plant	FAM	+	
	Vertebrates	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96 / Dx/ Opus	Plant	FAM	+	
	Vertebrates	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Plant	green	+	
	Vertebrates	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Plant	green	+	Note: Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	Vertebrates	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Plant	465-510	+	
	Vertebrates	618-660	+	

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, negative extraction control, positive control.

Reactions needed for the qualitative detection of plant and vertebrates:

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 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.

With this sensitive real-time PCR kit it is possible to detect minimal contaminations by the target DNA (for example airborne pollen, human DNA from the operator). These can lead to positive signals of the negative controls.

Plant DNA is detected in the FAM-channel and vertebrate DNA is detected in the Cy5-channel.

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

If the sample DNA is detected before the signal of the Positive Control in the Cy5 channel, the concentration of the sample is over 0.1 % vertebrate DNA. If the sample-DNA in the Cy5 channel is detected after the signal of the Positive Control, the concentration of the sample is below 0.1 % vertebrate DNA.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel.

result in the respective channel		Interpretation
FAM channel plant	Cy5 channel vertebrates	
positive	negative	plant DNA detected
negative	positive	vertebrate DNA detected
positive	positive	plant and vertebrate DNA detected
negative	negative	invalid

3 Further Information

3.1 Product Information

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

3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to info@congen.de.