

CONGEN

SureFood® ANIMAL QUANT Pork

Art. No. S1011
2 x 50 rxn

User Manual



August 2026

 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	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.7	Geräteeinstellungen	5
1.8	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Quantitative Analyse	6
2.1	Protokoll	6
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	6
2.1.2	Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen	7
2.1.3	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	8
3	Grenzen der Methode	9
4	Weitere Informationen	9
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	9
4.2	Technischer Support	9
4.3	Vertrieb und Bestellung	9



Content

1	General Information	10
1.1	Description	10
1.2	Limit of Detection and Limit of Quantification	10
1.3	DNA-preparation	11
1.4	Kit components and storage	11
1.5	Additionally required equipment and materials	11
1.6	Precautions for users	11
1.7	Setup.....	12
1.8	Detection channel Set-up	12
2	Quantitative Analysis	13
2.1	Protocol	13
2.1.1	Preparation of the master-mix	13
2.1.2	Preparation of the standard DNA dilutions	14
2.1.3	Preparation of the real-time PCR-mix	14
2.2	Interpretation of results	15
3	Limitations of the method	16
4	Further Information	16
4.1	Product Information	16
4.2	Technical Support	16
4.3	Distribution and Ordering	16

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® ANIMAL QUANT Pork ist eine real-time PCR zur relativen quantitativen Bestimmung des Schwein-DNA Anteils (*Sus scrofa*) relativ zum Gesamttier (Amnioten)-DNA Anteil in Fleischwaren. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis eines schweinspezifischen Gens (Nachweisgen) und ein real-time PCR-System für den Nachweis eines tierischen Gens (Referenzgen) in Lebensmitteln verwendet.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX OPUS 96, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent AriaDx.

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Schwein-spezifische real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die Bestimmungsgrenze für die schwein-spezifische PCR ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für Schwein bei 0,1 %.

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 QUANT Pork (2 x 50 rxn)

Art. Nr. S1011

August 2026

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation von Fleischwaren wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052) oder SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053) empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reference Reaction Mix	2 x 500 µl	Orange
2	Pork Reaction Mix	2 x 500 µl	Gelb
3	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	Weiß
5	Standard DNA	1 x 45 µl	Dunkelblau
6	Positive Control (100 % Schwein)	1 x 80 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°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 / SureFast® Advanced Art. Nr. S1053)
- Real-time PCR-Gerät
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	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

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Für zusätzliche Informationen wird auf die jeweilige Cycler-Bedienungsanleitung verwiesen.

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent AriaMx / Dx	Schwein	FAM	+	
	Referenz	FAM	+	
Applied Biosystems™ QuantStudio™	Schwein	FAM	+	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	Referenz	FAM	+	
Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus	Schwein	FAM	+	Baseline Einstellungen: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	Referenz	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Schwein	green	+	Ignore cycles before , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungs- anleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	Referenz	green	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Schwein	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	Referenz	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Schwein	465-510	+	Quantitative Auswertung erfolgt über den Analyse Typ „Fit Points“.
	Referenz	465-510	+	

2 Quantitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben, Kontrollreaktionen und Standards) ist zu berechnen.

Zur Auswertung benötigte Reaktionen für den Referenz-Nachweis (siehe 2.2):

5 Reaktionen für die Standardkurve

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Zur Auswertung benötigte Reaktionen für den Schwein-Nachweis (siehe 2.2):

5 Reaktionen für die Standardkurve

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 2x Positive Control)

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.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus verwendeten Prep Kit
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigelegte Positive Control

2.1.2 Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Referenzgen- (**Reference**) und der Nachweisgen- (**Pork**) Standardkurven wird die Standard DNA (**Code 5**) in 1:10-Schritten in Dilution Buffer (**Code 4**) verdünnt. Insgesamt werden 5 Verdünnungen benötigt. Es werden 5 Reaktionsgefäße (markiert mit S1 bis S5) vorbereitet und mit je 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) befüllt.

Nach folgender Tabelle sind die Verdünnungen herzustellen:

Standard	Verdünnungen	Kopienanzahl je µl	Gesamtkopienanzahl je Reaktion**
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 Kopien	500.000 Kopien
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1	10.000 Kopien	50.000 Kopien
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2	1.000 Kopien	5.000 Kopien
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3	100 Kopien	500 Kopien
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S4	10 Kopien	50 Kopien

****Hinweis:** Es werden 5 µl DNA im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

2.1.3 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control und der Standardverdünnungen in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und 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 wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Reference, Pork**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisgen (**Pork**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das Referenzgen (**Reference**) wiederholt. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

Außerdem ist sicherzustellen, dass die zu analysierende Probe innerhalb des linearen Bereichs der Standardkurve liegt. Zeigt die Probe vor dem höchsten Standardwert eine Amplifikation, empfehlen wir diese entsprechend zu verdünnen und erneut zu messen.

Zur Auswertung und Berechnung der Ergebnisse kann die SureFood® ANIMAL Quant - Auswertevorlage (siehe 4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel) verwendet werden. Bitte folgen Sie dabei den entsprechenden Hinweisen in der Vorlage.

Aus den berechneten Kopienzahlen für die untersuchte Probe und der Positive Control wird das Verhältnis von Schwein-Nachweisgen (**Pork**) zum Tier-Referenzgen (**Reference**) ermittelt, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird:

Probe Pork	1.350 Kopien	Positive Control Pork	900 Kopien
Probe Reference	45.000 Kopien	Positive Control Reference	1.100 Kopien

Zur Berechnung des prozentualen Anteils ist die Nachweisgen Kopienzahl durch die Referenzgen Kopienzahl zu dividieren und mit einhundert zu multiplizieren.

Schwein-DNA-Anteil = **Pork-Kopienzahl** * 100 / **Reference Kopienzahl**

Proben-DNA **Schwein-Anteil** = $1.350 * 100 / 45.000$ Proben-DNA **Schwein-Anteil** = 3 %

Somit ergibt sich für die Probe ein **Schwein-DNA-Anteil** von 3,0 % und nach derselben Berechnung ein Wert von 81,8 % für die Positive Control.

Zur Berechnung des endgültigen Wertes für die Probe, wird ein Korrekturfaktor (K) eingeführt, der Lauf-zu-Lauf-Schwankungen bereinigt. Dabei wird der im Lauf berechnete Wert für die Positive Control mit dem wahren Wert der Positive Control zu einem Korrekturfaktor K berechnet. Der wahre Wert der Positive Control beträgt 100 % **Schwein-Anteil**.

$K = \text{wahrer Wert} / \text{bestimmter Wert}$

$K (\text{Beispiel}) = 100 \% / 81,8 \% = 1,2$

Der berechnete DNA-Anteil der Probe ist das Produkt aus dem in diesem Lauf bestimmten Anteil und K.

DNA-Anteil Probe = bestimmter **DNA-Anteil Probe** * K Probe (Beispiel) = $3,0 \% * 1,2 = 3,6 \%$

Somit errechnet sich ein **Schwein-DNA-Anteil von 3,6 %** für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Innereien, insbesondere Niere und Leber, weisen pro Gewichtsanteil aufgrund einer höheren Zellzahl einen entsprechend höheren DNA-Anteil als Muskelfleisch auf. Dies kann bei der Berechnung des prozentualen Spezies-Anteils zu einer „Über“quantifizierung des Tieres, aus dem die Innereien stammen, führen. Bei Fleischprodukten mit Innereianteilen > 5 % ist daher Vorsicht bei der Angabe der Speziesanteile geboten.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z.B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Microsoft Excel Berechnungsvorlage und detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR-Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validierungsreport auf Anfrage

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

4.3 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 SureFood® ANIMAL QUANT Pork real-time PCR detects the relative pork (*Sus scrofa*) DNA amount to the total animal (amniotic) DNA content in meat samples. Therefore, the kit contains two PCR systems, one for detection of a pork specific gene (**Pork** detection gene) and one for the detection of an animal gene (**Reference** gene).

The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments. The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems™ QuantStudio™, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX OPUS 96, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent AriaMx.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The pork specific 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.

The limit of quantitation depends on the concentration of the sample DNA used in the analysis. For example, if 50,000 target-sequence copies of the reference gene are present, the relative quantitation limit for pork DNA is 0.1 %.

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 QUANT Pork

(2 x 50 rxn)

Art. No. S1011

August 2026

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of meat samples the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052) or SureFast® PREP Advanced (Art. No. S1053) is recommended.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reference Reaction Mix	2 x 500 µl	Orange
2	Pork Reaction Mix	2 x 500 µl	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	White
5	Standard DNA	1 x 45 µl	Dark Blue
6	Positive Control (100 % pork)	1 x 80 µl	Light Blue

Store all reagents at -28 to -16°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 / SureFast® PREP Advanced Art. No. S1053)
- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumable (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 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

SureFood® ANIMAL QUANT Pork (2 x 50 rxn)

Art. No. S1011

August 2026

1.7 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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

1.8 Detection channel Set-up

For additional details see cycler operating instructions for real-time PCR device.

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent AriaDx /Mx	Pork	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
Applied Biosystems™ QuantStudio™	Pork	FAM	+	Check the passive reference option ROX is none.
	Reference	FAM	+	
Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus	Pork	FAM	+	Baseline Settings: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	Reference	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Pork	green	+	Ignore cycles before , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	Reference	green	+	
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.
	Reference	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Pork	465-510	+	For the quantitative analysis use the type "Fit Points".
	Reference	465-510	+	

2 Quantitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples, control reactions and standards) for the specific PCR assay.

Required reactions for the evaluation of the reference detection (see 2.2):

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls* (1x negative control, 2x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

Required reactions for the evaluation of pork detection (see 2.2):

5 reactions for the standard curve

3 reactions for controls* (1x negative control, 2x 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 by vortexing 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.

*** Description of the controls**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – component from used PREP kit
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

2.1.2 Preparation of the standard DNA dilutions

Dilute the Standard DNA (**Code 5**) in 1:10 steps in Dilution Buffer (**Code 4**) in order to prepare different DNA concentrations for the standard curves of the reference gene (**Reference**) and the detection gene (**Pork**). Prepare 5 dilutions of the supplied Standard DNA (**Code 5**) with the supplied Dilution Buffer (**Code 4**). Prepare 5 reaction tubes (labeled S1 to S5) and add 45 µl Dilution Buffer (**Code 4**) each.

The following procedure is recommended:

Standard	Dilutions	Copy number per µl	Final copy number per reaction**
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100,000 copies	500,000 copies
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1	10,000 copies	50,000 copies
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2	1,000 copies	5,000 copies
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	500 copies
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S4	10 copies	50 copies

****Note:** 5 µl of standard DNA are used for each calibration point. The final copy number per reaction is to be entered in the analysis software of the real-time PCR detection system.

2.1.3 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control and the standard dilutions 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 calculation for both reaction systems (**Reference, Pork**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**Pork**) and make the evaluation according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. Repeat the same procedure for the reference gene system (**Reference**). The value for the slope of the standard curve has to be between -3.1 and -3.6 and the correlation coefficient $R^2 > 0.98$. In case of different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

During evaluation, it must be ensured that the sample to be analysed lies within the linear range of the standard curve. If the sample shows amplification before the highest standard, it should be diluted accordingly and measured again.

For the evaluation and calculation of the result, the SureFood® ANIMAL Quant – Data interpretation sheet (see 4.1 Product information) can be used. Please follow the introductions provided in the template.

By using the calculated copy numbers for **Reference** and **Pork** the relative pork content of the sample DNA and the Positive Control can be determined in the following way (example):

Sample Pork	1,350 copies	Positive Control Pork	900 copies
Sample Reference	45,000 copies	Positive Control Reference	1,100 copies

Divide the copy number of the specific system by the copy number of the reference gene system and multiply by 100 to obtain the percentage.

Pork DNA content = **Pork** copy number * 100 / **Reference** copy number

sample **Pork** DNA content = $1,350 * 100 / 45,000$ sample **Pork** DNA content = 3 %

For the given example the numbers lead to a **Pork** DNA content of 3.0 %, for the sample and 81.8 % for the Positive Control with the same calculation.

For a final calculation the use of a correction factor K for the correction of run-to-run fluctuations is necessary. The correction factor is the relation of the true percentage value of the Positive Control (100 % **Pork** content) and the measured percentage of the Positive Control.

K = true value / measured value K (example) = $100 \% / 81.8 \% = 1.2$

The measured DNA content for the sample is multiplied with K to obtain a corrected DNA content.

sample DNA content = measured sample DNA content * K sample (example) = $3.0 \% * 1.2 = 3.6 \%$

For that example the **Pork DNA content is 3.6 %**.

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- Innards, particularly kidney or liver, show a higher DNA content per weight unit when compared to muscle tissue. This could lead to over-estimation of the species content of the animal from which the innards come from. For meat products with innards content > 5 % care must be taken when relative species contents are reported.
- In highly processed samples, the limit of detection may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Microsoft Excel template of calculation and detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/downloads)
- Product-related documents (Download: www.congen.de/en/eifu/)
- Validation Report upon request

4.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

4.3 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

