

**CONGEN**

# **SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC**

Art. No. S6121  
100 rxn

## **User Manual**



**June 2025**

 **Inhalt**

|       |                                                    |   |
|-------|----------------------------------------------------|---|
| 1     | Allgemeines.....                                   | 3 |
| 1.1   | Beschreibung.....                                  | 3 |
| 1.2   | Nachweisgrenze.....                                | 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     | Qualitative Analyse .....                          | 6 |
| 2.1   | Protokoll .....                                    | 6 |
| 2.1.1 | Herstellen des Master-Mix .....                    | 6 |
| 2.1.2 | Herstellen des real-time PCR-Mix .....             | 6 |
| 2.2   | Interpretation der Ergebnisse .....                | 7 |
| 3     | Grenzen der Methode.....                           | 8 |
| 4     | Weitere Informationen .....                        | 8 |
| 4.1   | Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....            | 8 |
| 4.2   | Technischer Support .....                          | 8 |
| 4.3   | Vertrieb und Bestellung .....                      | 8 |



## **Content**

|       |                                                     |    |
|-------|-----------------------------------------------------|----|
| 1     | General Information .....                           | 9  |
| 1.1   | Description .....                                   | 9  |
| 1.2   | Limit of Detection .....                            | 9  |
| 1.3   | DNA-preparation .....                               | 10 |
| 1.4   | Kit components and storage .....                    | 10 |
| 1.5   | Additionally required equipment and materials ..... | 10 |
| 1.6   | Precautions for users .....                         | 10 |
| 1.7   | Setup.....                                          | 11 |
| 1.8   | 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     | Limitations of the method .....                     | 14 |
| 4     | Further Information .....                           | 14 |
| 4.1   | Product Information .....                           | 14 |
| 4.2   | Technical Support .....                             | 14 |
| 4.3   | Distribution and Ordering .....                     | 14 |

## **1 Allgemeines**

### **1.1 Beschreibung**

SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von Rind (*Bos taurus*), Schaf (*Ovis aries*) und Ziege (*Capra hircus*) in Lebens- und Futtermitteln.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA ausgestattet (IAAC). 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 vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96/Dx, Qiagen Rotor-Gene Q, R-Biopharm RIDA®CYCLER, und Roche LightCycler® 480 II.

### **1.2 Nachweisgrenze**

Die SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC real-time PCR ist so ausgelegt, dass Rinder-, Schaf- sowie Ziegen-DNA in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 0,01 % nachweisbar ist.

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

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.

**Hinweis:** Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen\* zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert vor 20 erreicht wird.

\* z.B. 99,9 % Rind und 0,1 % Schaf

## 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 11 µl   | Rot         |
| 3        | Positive Control | 1 x 200 µl  | Hellblau    |

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut werden.**

## 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 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

|                                        | <b>Blockcycler &amp;<br/>R-Biopharm RIDA®CYCLER</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            |

### 1.8 Detektionskanaleinstellungen

| <b>Real-time PCR<br/>Gerät</b>           | <b>Nachweis</b> | <b>Detektions-<br/>kanal</b> | <b>Quencher</b> | <b>Bemerkung</b>                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agilent AriaMx<br/>/Dx</b>            | Rind            | FAM                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | IAAC            | HEX                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Ziege           | ROX                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Schaf           | Cy5                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Bio-Rad CFX96 /<br/>Dx / Opus</b>     | Rind            | FAM                          | +               | Baseline Einstellungen:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>Baseline subtracted curve fit</li> <li>Apply fluorescnce drift correction</li> </ul>                                                             |
|                                          | IAAC            | VIC/HEX                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Ziege           | ROX                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Schaf           | Cy5                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>R-Biopharm<br/>RIDA®CYCLER</b>        | Rind            | green                        | +               | <b>Ignore cycles before</b> , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt.<br>Siehe Seite 47 Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse. |
|                                          | IAAC            | yellow                       | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Ziege           | orange                       | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Schaf           | red                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Qiagen Rotor-<br/>Gene Q</b>          | Rind            | green                        | +               | <b>Achtung:</b> Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.                                                                     |
|                                          | IAAC            | yellow                       | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Ziege           | orange                       | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Schaf           | red                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Roche<br/>LightCycler®<br/>480 II</b> | Rind            | 465-510                      | +               | Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.                                                                                                                                                |
|                                          | IAAC            | 533-580                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Ziege           | 533-610                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | Schaf           | 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, Extraktionskontrolle und Positive Control.

Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

#### **Benötigte Reaktionen für den qualitativen Rind-, Schaf- und Ziege-Nachweis:**

3 Reaktionen für Kontrollen\* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x 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.

Die Taq Polymerase sollte nicht im Vortex gemischt werden.

#### **Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:**

| <b>Komponenten des Master-Mix</b> | <b>Menge pro Reaktion</b> | <b>10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)</b> |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| Reaction Mix                      | 19,9 µl                   | 218,9 µl                               |
| Taq Polymerase                    | 0,1 µl                    | 1,1 µl                                 |
| <b>Gesamtvolumen</b>              | <b>20 µl</b>              | <b>220 µl</b>                          |

**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
- 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.

#### **\* Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – nur PREP Reagenzien
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügte Positive Control

## 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.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Rind, im ROX-Kanal der Parameter Ziege und im Cy5-Kanal der Parameter Schaf detektiert (siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird ein möglicher tierischer DNA-Anteil in der Probe nachgewiesen. Ist keine tierische DNA in der Probe vorhanden, wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

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

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

Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal deutlich vor dem Signal der internen Amplifikationskontrolle (erkennbar an der Negativkontrolle) wird das generelle Vorhandensein von tierischer DNA in der Probe als **positiv** nachgewiesen (siehe Tabelle).

Zeigt das interne Signal im VIC/HEX-Kanal einen Cp-Wert im Bereich der Negativkontrolle, dann wird die PCR zwar nicht inhibiert, jedoch liegt entweder gar keine oder sehr wenig tierische DNA vor.

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 Rind, Schaf oder Ziege mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

| Ergebnis im jeweiligen Kanal |                    |                    |                                                    | Interpretation             |
|------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------------------------|----------------------------|
| FAM-Kanal<br>Rind            | ROX-Kanal<br>Ziege | Cy5-Kanal<br>Schaf | VIC/HEX-Kanal<br>Tier + IAC                        |                            |
| <b>positiv</b>               | negativ            | negativ            | <b>positiv</b>                                     | Rind-DNA nachweisbar       |
| negativ                      | <b>positiv</b>     | negativ            | <b>positiv</b>                                     | Ziegen-DNA nachweisbar     |
| negativ                      | negativ            | <b>positiv</b>     | <b>positiv</b>                                     | Schaf-DNA nachweisbar      |
| negativ                      | negativ            | negativ            | <b>positiv,<br/>Cp &lt; Negativ-<br/>kontrolle</b> | Wirbeltier-DNA nachweisbar |
| negativ                      | negativ            | negativ            | negativ                                            | nicht auswertbar           |

**Hinweis:** Die in der obenstehenden Tabelle dargestellten Ergebnisse dienen lediglich als Beispiel. Darüber hinaus sind weitere Kombinationen möglich.



### **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.
- Bei Anwesenheit von DNA aus mehr als einer Tierart kann das Mischungsverhältnis der DNAs einen kompetitiven Einfluss auf die Intensität der absoluten Fluoreszenz haben. Je geringer der relative Gehalt der zu bestimmenden DNA in einem Gemisch tierischer DNAs ist, desto geringer ist das Fluoreszenzniveau der Amplifikationskurve.
- 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**

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/download](http://www.congen.de/download))
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: [www.congen.de/eifu/](http://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](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

**r-biopharm®**



## **1 General Information**

### **1.1 Description**

The SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific beef (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*) DNA sequences in food and feed.

Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for vertebrates DNA (IAAC). 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). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

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

### **1.2 Limit of Detection**

The SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC real-time PCR is developed for the detection of beef, sheep and goat DNA in muscle meat mixture at a relative amount 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 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.

**Note:** Inconsistent mixing ratios\* may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (Cp value < 20).

\* e.g. 99.9 beef and 0.1% sheep

**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 11 µl   | Red        |
| 3        | Positive Control | 1 x 200 µl  | Light Blue |

**Store all reagents at -28 to -16°C and protected from light. The tube of the Taq Polymerase should not be thawed.**

**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 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.

### 1.7 Setup

|                                        | <b>Blockcycler &amp;<br/>R-Biopharm RIDA®CYCLER</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            |

### 1.8 Detection channel Set-up

| <b>Real-time PCR device</b>      | <b>Detection</b> | <b>Detection channel</b> | <b>Quencher</b> | <b>Note</b>                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------|------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agilent AriaMx / Dx</b>       | Beef             | FAM                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | IAAC             | HEX                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Goat             | ROX                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Sheep            | Cy5                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus</b> | Beef             | FAM                      | +               | Baseline Settings: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baseline subtracted curve fit</li> <li>• Apply fluorescence drift correction</li> </ul>                                                            |
|                                  | IAAC             | VIC/HEX                  | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Goat             | ROX                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Sheep            | Cy5                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>    | Beef             | green                    | +               | <b>Ignore cycles before</b> , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cyclor operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter. |
|                                  | IAAC             | yellow                   | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Goat             | orange                   | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Sheep            | red                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>       | Beef             | green                    | +               | <b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels                                                                                      |
|                                  | IAAC             | yellow                   | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Goat             | orange                   | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Sheep            | red                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Roche LightCycler® 480 II</b> | Beef             | 465-510                  | +               | The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.                                                                                                                                              |
|                                  | IAAC             | 533-580                  | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Goat             | 533-610                  | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | Sheep            | 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.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, Positive Control.

The reaction mix contains an internal amplification control (Inhibition control) per reaction.

#### **Reactions needed for the qualitative detection of beef, sheep and goat:**

3 reactions for controls\* (1x negative control, 1x extraction control, 1x 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.

The tube of the Taq Polymerase should not be mixed by vortexing.

#### **Example for the calculation and preparation of 10 reactions:**

| <b>Components of the master-mix</b> | <b>Amount per reaction</b> | <b>10 reactions (with 10% excess)</b> |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Reaction Mix                        | 19.9 µl                    | 218.9 µl                              |
| Taq Polymerase                      | 0.1 µl                     | 1.1 µl                                |
| <b>Total volume</b>                 | <b>20 µl</b>               | <b>220 µl</b>                         |

**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.
- 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.

#### **\* Description of the controls**

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

**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.

Beef DNA is detected in the FAM-channel, goat DNA is detected in the ROX-channel and sheep DNA is detected in the Cy5-channel. In the VIC/HEX-channel it is possible to detect animal DNA in the sample as well as the amplification control (IAC) in a sample with no animal DNA inside (see also table below).

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

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel. The internal amplification control (inhibition control) of the sample has to be **positive** with a shift in Cp-Value  $\leq 2$  compared to the negative control in the VIC/HEX-channel.

If the internal control signal in the VIC/HEX-channel of the sample DNA is detected significantly before the signal of the negative control the sample is stated **positive** for animal DNA.

Is the Cp-value of the internal control in the VIC/HEX-channel in the range of the negative control the sample contains no PCR-inhibiting substances but only a low amount or no animal DNA.

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 beef, sheep or goat PCR assay.

| result in the respective channel |                     |                      |                                                   | Interpretation           |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------------------------------------|--------------------------|
| FAM channel<br>beef              | ROX channel<br>goat | Cy5 channel<br>sheep | VIC/HEX channel<br>animal + IAC                   |                          |
| <b>positive</b>                  | negative            | negative             | <b>positive</b>                                   | beef DNA detected        |
| negative                         | <b>positive</b>     | negative             | <b>positive</b>                                   | goat DNA detected        |
| negative                         | negative            | <b>positive</b>      | <b>positive</b>                                   | sheep DNA detected       |
| negative                         | negative            | negative             | <b>positive,<br/>Cp &lt; negative<br/>control</b> | vertebrates DNA detected |
| negative                         | negative            | negative             | negative                                          | invalid                  |

**Note: The results displayed in the table above represent merely an example. Additional combinations are also possible.**

### 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.
- If the sample contains more than one animal species the DNA mixture can have a competitive influence on the absolute fluorescence. The lower the concentration of the determinant DNA is in a mixture of animal DNAs the lower is the fluorescence level of the amplification curve.
- 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

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: [www.congen.de/en/downloads](http://www.congen.de/en/downloads))
- Product-related documents (Download: [www.congen.de/en/eifu/](http://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](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

