

CONGEN

SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC

Art. No. S6123
100 rxn

User Manual



November 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	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	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	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	Qualitative Analysis	14
2.1	Protocol	14
2.1.1	Preparation of the master-mix	14
2.2	Preparation of the real-time PCR-mix.....	14
2.3	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 ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von Schwein (*Sus scrofa*), Huhn (*Gallus gallus*) und Pute (*Meleagris gallopavo*) 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 Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Roche cobas® z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 480 II und Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC real-time PCR ist so ausgelegt, dass Schwein-, Huhn- sowie Puten-DNA in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 0,1 % 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 % Schwein und 0,1 % Huhn

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052) 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)
- 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.

SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC (100 rxn)

Art. Nr. S6123

November 2025

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Schwein	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	Pute	ROX	+	
	Huhn	Cy5	+	
Agilent AriaMx /Dx	Schwein	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	Pute	ROX	+	
	Huhn	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	Schwein	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAAC	VIC	None	
	Pute	ROX	None	
	Huhn	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus	Schwein	FAM	+	Baseline Einstellungen: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	IAAC	VIC/HEX	+	
	Pute	ROX	+	
	Huhn	Cy5	+	
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.
	IAAC	yellow	+	
	Pute	orange	+	
	Huhn	red	+	

SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC (100 rxn)

Art. Nr. S6123

November 2025

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
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.
	IAAC	yellow	+	
	Pute	orange	+	
	Huhn	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Schwein	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAAC	533-580	+	
	Pute	533-610	+	
	Huhn	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Schwein	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAAC	540-580	+	
	Pute	540-610	+	
	Huhn	610-670	+	

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 Schwein-, Huhn- und Pute-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 aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 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
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße und verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control 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.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus dem verwendeten Prep Kit
- 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 Schwein, im ROX-Kanal der Parameter Pute und im Cy5-Kanal der Parameter Huhn detektiert. 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 (siehe Tabelle).

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 ≤ 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 mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal Schwein	ROX-Kanal Pute	Cy5-Kanal Huhn	VIC/HEX-Kanal Tier + IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv	Schwein-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	Pute-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	Huhn-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv, Cp < NTC*	Keine Ziel DNA, aber DNA von anderen Wirbeltieren
negativ	negativ	negativ	positiv, Cp = NTC*	Keine 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.

***NTC=Negativkontrolle**

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)
- 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

r-biopharm®



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific pork (*Sus scrofa*), chicken (*Gallus gallus*) and turkey (*Meleagris gallopavo*) 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 Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Roche cobas® z 480 Analyzer, Roche LightCycler® 480 II and Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC real-time PCR is developed for the detection of pork, chicken and turkey DNA in muscle meat mixture at a relative amount of 0.1%.

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 pork and 0.1% chicken

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052) 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)
- 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.

SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC (100 rxn)

Art. No. S6123

November 2025

1.7 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcyclcr
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

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	pork	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	turkey	ROX	+	
	chicken	Cy5	+	
Agilent AriaMx / Dx	pork	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	turkey	ROX	+	
	chicken	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	pork	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAAC	VIC	None	
	turkey	ROX	None	
	chicken	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus	pork	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	IAAC	VIC/HEX	+	
	turkey	ROX	+	
	chicken	Cy5	+	
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 cyclcr operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	IAAC	yellow	+	
	turkey	orange	+	
	chicken	red	+	

SureFood® ANIMAL ID 4plex Pork/Chicken/Turkey+IAAC (100 rxn)

Art. No. S6123

November 2025

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
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.
	IAAC	yellow	+	
	turkey	orange	+	
	chicken	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	pork	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAAC	533-580	+	
	turkey	533-610	+	
	chicken	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	pork	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAAC	540-580	+	
	turkey	540-610	+	
	chicken	610-670	+	

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 and Positive Control.

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

Reactions needed for the qualitative detection of pork, chicken and turkey:

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 thawed and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

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

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

2.2 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 – components from used Prep Kit
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

2.3 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.

Pork DNA is detected in the FAM-channel, turkey DNA is detected in the ROX-channel and chicken 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 ≤ 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 PCR assay.

result in the respective channel				Interpretation
FAM channel pork	ROX channel turkey	Cy5 channel chicken	VIC/HEX channel animal + IAC	
positive	negative	negative	positive	pork DNA detected
negative	positive	negative	positive	turkey DNA detected
negative	negative	positive	positive	chicken DNA detected
negative	negative	negative	positive, Cp < NTC*	no target DNA, but DNA from other vertebrates is detected
negative	negative	negative	positive, Cp = NTC*	vertebrates DNA is not detected
negative	negative	negative	negative	invalid

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

***NTC = negative control**

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)
- 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

