

CONGEN

SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Horse/Pork+IAAC

Art. No. S6126
100 rxn

User Manual



May 2024

 **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	Geräteeinstellungen	4
1.7	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	Setup	10
1.7	Detection channel Set-up	11
2	Qualitative Analysis	12
2.1	Protocol	12
2.1.1	Preparation of the master-mix	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	12
2.2	Interpretation of results	13
3	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/Horse/Pork+IAAC ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von von Rind (*Bos taurus*), Pferd (*Equus caballus*) und Schwein (*Sus scrofa*) 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 technische Geräteverifizierung erfolgte am Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, Bio Molecular Systems MIC, Bio-Rad CFX96, Roche cobas® z 480 Analyzer und Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Horse/Pork+IAAC real-time PCR ist so ausgelegt, dass Rind- und Pferd-DNA in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 0,1 % nachweisbar ist und Schweine-DNA ab einem relativen Anteil von 0,5%.

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 % Pferd

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 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 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

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Rind	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	Pferd	ROX	+	
	Schwein	Cy5	+	
Agilent AriaMx /Dx	Rind	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	Pferd	ROX	+	
	Schwein	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	Rind	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAAC	VIC	None	
	Pferd	ROX	None	
	Schwein	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx/ Opus	Rind	FAM	+	
	IAAC	VIC/HEX	+	
	Pferd	ROX	+	
	Schwein	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rind	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	Pferd	orange	+	
	Schwein	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Rind	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAAC	533-580	+	
	Pferd	533-610	+	
	Schwein	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Rind	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAAC	540-580	+	
	Pferd	540-610	+	
	Schwein	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 Rind-, Pferd- und Schwein-Nachweis:

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

Jede 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:

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 (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Reaktionsgefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Rind, im ROX-Kanal der Parameter Pferd und im Cy5-Kanal der Parameter Schwein 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 ≤ 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, Pferd oder Schwein mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal Rind	ROX-Kanal Pferd	Cy5-Kanal Schwein	VIC/HEX-Kanal Tier + IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv	Rind-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	Pferd-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	Schwein-DNA nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv	Rind-, Pferd- und Schwein-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv, Cp < Negativ- kontrolle	Wirbeltier-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

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.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- 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 Beef/Horse/Pork+IAAC is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific beef (*Bos taurus*), horse (*Equus caballus*) and pork (*Sus scrofa*) 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 technical verification of instruments was performed on Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Applied Biosystems 7500, Bio Molecular Systems MIC, Bio-Rad CFX96, Roche cobas® z 480 Analyzer and Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Horse/Pork +IAAC real-time PCR is developed for the detection of beef and horse DNA in muscle meat mixture at a relative amount of 0.1 % and pork DNA at a relative amount of 0.5%.

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 % horse

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 bis -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 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 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

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	beef	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	horse	ROX	+	
	pork	Cy5	+	
Agilent AriaMx / Dx	beef	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
	horse	ROX	+	
	pork	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	beef	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAAC	VIC	None	
	horse	ROX	None	
	pork	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96 / Dx/ Opus	beef	FAM	+	
	IAAC	VIC/HEX	+	
	horse	ROX	+	
	pork	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	beef	green	+	
	IAAC	yellow	+	
	horse	orange	+	
	pork	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	beef	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAAC	533-580	+	
	horse	533-610	+	
	pork	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	beef	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAAC	540-580	+	
	horse	540-610	+	
	pork	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, Positive Control.

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

Reactions needed for the qualitative detection of beef, horse and pork:

3 reactions for controls (1x negative control, 1x extraction control, 1 x 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:

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.

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

Beef DNA is detected in the FAM-channel, horse DNA is detected in the ROX-channel and pork 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 beef, horse or pork PCR assay.

result in the respective channel				Interpretation
FAM channel beef	ROX channel horse	Cy5 channel pork	VIC/HEX channel animal + IAC	
positive	negative	negative	positive	beef DNA detected
negative	positive	negative	positive	horse DNA detected
negative	negative	positive	positive	pork DNA detected
positive	positive	positive	positive	beef, horse and pork DNA detected
negative	negative	negative	positive, Cp < negative control	vertebrates DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid

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.

4 Further Information

4.1 Product Information

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

r-biopharm®

