

**CONGEN**

# **SureFood® ALFALFA**

Art. No. S7012  
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 .....                          | 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® ALFALFA ist eine real-time PCR zum direkten, qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz von Luzerne (*Medicago sativa*) in Lebens- und Futtermitteln.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) ausgestattet. 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 zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX OPUS 96, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Agilent AriaDx.

### **1.2 Nachweisgrenze**

Die SureFood® ALFALFA real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien.

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

**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 80 µl   | Dunkelrot   |
| 3        | Positive Control | 1 x 200 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 / SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053)
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 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                                 | 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

| <b>Real-time PCR<br/>Gerät</b>           | <b>Nachweis</b> | <b>Detektions-<br/>kanal</b> | <b>Quencher</b> | <b>Bemerkung</b>                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agilent AriaDx /<br/>Mx</b>           | Luzerne         | FAM                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | IAC             | HEX                          | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Bio-Rad<br/>CFX96/Dx/Opus</b>         | Luzerne         | FAM                          | +               | Baseline Einstellungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Baseline subtracted curve fit</li> <li>• Apply fluorescence drift correction</li> </ul>                                                           |
|                                          | IAC             | VIC/HEX                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>R-Biopharm<br/>RIDA®CYCLER</b>        | Luzerne         | 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. |
|                                          | IAC             | yellow                       | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Qiagen Rotor-<br/>Gene Q</b>          | Luzerne         | green                        | +               | Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.<br>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.                                                                         |
|                                          | IAC             | yellow                       | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Roche<br/>LightCycler®<br/>480 II</b> | Luzerne         | 465-510                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |
|                                          | IAC             | 533-580                      | +               |                                                                                                                                                                                                                    |

## 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 benötigt: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positive Control.

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

#### **Benötigte Reaktionen für den qualitativen Luzerne-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.

#### **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                          |
| <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 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 Luzerne detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter Luzerne bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der IAC führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positive Control zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter Luzerne bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung  $\leq 2$  zur Negativkontrolle ist.

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 Luzerne mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

**Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen**

|                                  | Spezifikationsbereich | Interne Amplifikationskontrolle (IAC) |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Negativkontrolle                 | negativ               | $25 \leq Cp \leq 34$                  |
| Positive Control (FAM – Luzerne) | $25 \leq Cp \leq 33$  | nicht relevant                        |

### 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 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/))
- Validierungsdaten 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)



## **1 General Information**

### **1.1 Description**

The SureFood® ALFALFA is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific alfalfa (*Medicago sativa*) DNA sequence in food and feed.

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). 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). Also 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 two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96 Dx, Bio-Rad CFX OPUS 96, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Agilent AriaDx.

### **1.2 Limit of Detection**

The SureFood® ALFALFA real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies.

The assay limit of detection 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.

**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 80 µl   | Dark Red   |
| 3        | Positive Control | 1 x 200 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 / SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- 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.

## 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                                 | 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 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 AriaDx / Mx</b>       | Alfalfa          | FAM                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | IAC              | HEX                      | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Bio-Rad CFX96/Dx/Opus</b>     | Alfalfa          | FAM                      | +               | Baseline Settings: <ul style="list-style-type: none"> <li>Baseline subtracted curve fit</li> <li>Apply fluorescence drift correction</li> </ul>                                                                |
|                                  | IAC              | VIC/HEX                  | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>    | Alfalfa          | 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 cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter. |
|                                  | IAC              | yellow                   | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>       | Alfalfa          | green                    | +               | <b>Note:</b> Please use only 0.1 ml reaction tube.<br>The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.                                                                                   |
|                                  | IAC              | yellow                   | +               |                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Roche LightCycler® 480 II</b> | Alfalfa          | 465-510                  | +               |                                                                                                                                                                                                                |
|                                  | IAC              | 533-580                  | +               |                                                                                                                                                                                                                |

## 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.

The following control reactions are needed 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 alfalfa detection:**

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.

#### **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                          |
| <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 – components from used Prep Kit
- 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.

Alfalfa DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-channel the amplification control (IAC) is detected.

A sample is stated **positive** for alfalfa, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the IAC.

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

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

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 alfalfa PCR assay.

**The following table shows the specification ranges of the kit controls**

|                                     | Specification range  | Internal amplification control (IAC) |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| negative control                    | negative             | $25 \leq Cp \leq 34$                 |
| Positive Control<br>(FAM – Alfalfa) | $25 \leq Cp \leq 33$ | not relevant                         |

### 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.
- 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)

