

**SureFood® ANIMAL QUANT Beef (2 x 50 Reakt.)**

Art. Nr. S1010

Version 2.3

Beschreibung

Dieser Test dient der relativen quantitativen Bestimmung des Rind-DNA Anteils relativ zum Gesamttier-DNA Anteil in Fleischwaren. Hierzu wird ein real-time PCR-System für den Nachweis eines rindspezifischen Gens (**Bos** Nachweisgen) und ein PCR-System für den Nachweis eines tierischen Gens (**Ref** Referenzgen) verwendet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.) verwendet werden.

Nachweisgrenze

Die rindspezifische PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt. Die Bestimmungsgrenze für den rindspezifischen Nachweis ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten DNA. Bei einer Kopienanzahl des Referenzgens von 50.000 Kopien liegt die Bestimmungsgrenze für Rind bei 0,04 %.

Kreuzreaktionen

Das rindspezifische Nachweisverfahren weist Querempfindlichkeiten zu *Bison sp.* (100%) und zu Wasserbüffel (*Bubalis arnee*) mit 0,6% auf.

DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation von Fleischwaren wird das SureFood® PREP Basic Kit empfohlen.

Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Ref Reaction Mix	2 x 450 µl	Gelb
2	Bos Reaction Mix	2 x 450 µl	Gelb
3	Taq Polymerase	1 x 15 µl	Rot
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	Weiß
5	Standard DNA	1 x 25 µl	Dunkelblau
6	Positive Control (100% Rind)	1 x 25 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

Protokoll

1. Herstellen des Master-Mix

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

Benötigte Reaktionen für den Referenzgen-Nachweis:

Je Lauf: 5 Reaktionen für die Standardkurve
3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle und 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Benötigte Reaktionen für den Rind-Nachweis:

Je Lauf: 5 Reaktionen für die Standardkurve
3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle und 2x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen 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%)
Ref Reaction Mix oder Bos Reaction Mix	18,0 µl	198,0 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	18,1 µl	199,1 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler/LightCycler® 480	Rotorcyclcr
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 62°C 30 sec, 65°C	1 min, 95°C 45 5 sec, 95°C 10 sec, 62°C 15 sec, 65°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: TAMRA Passive Reference: none	LightCycler® Channel: 530/610 oder F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: FAM (Green)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

3. Herstellen der Standard DNA Verdünnungen

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

Standard	Verdünnungen	Kopienanzahl je µl	Gesamtkopienanzahl je Reaktion*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100.000 Kopien	200.000 Kopien
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1	10.000 Kopien	20.000 Kopien
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2	1000 Kopien	2.000 Kopien
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3	100 Kopien	200 Kopien
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S4	10 Kopien	20 Kopien

***Hinweis:** 2 µl DNA werden im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

Die hergestellten Standard Verdünnungen sind nach der Verwendung bei -20°C bis zum nächsten Gebrauch aufzubewahren. Die Verdünnungen sind bis zu 2 Monate bei -20°C stabil. Vor dem erneuten Gebrauch sind die Lösungen vollständig aufzutauen, im Vortex zu durchmischen und vor dem Öffnen zu zentrifugieren.

4. Herstellen des PCR-Mix

- Pipettieren von 18 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten, Kapillaren).
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 2 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 2 µl Positive Control und der Standard Verdünnungen in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Reaktionsgefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung wird nacheinander für beide Reaktionssysteme (**Ref, Bos**) durchgeführt. Es werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben für das Nachweisgen (**Bos**) markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Danach wird das gleiche Verfahren für das **Tier**-Referenzgen wiederholt. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

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

Probe Rind (Bos)	1350 Kopien	Positive Control Rind (Bos)	900 Kopien
Probe Tier (Ref)	45.000 Kopien	Positive Control Tier (Ref)	1100 Kopien

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

Rind DNA-Anteil = **Bos** Kopienzahl * 100 / **Ref** Kopienzahl

Proben-DNA **Rind** Anteil = $1350 * 100 / 45.000$

Proben-DNA **Rind** Anteil = 3 %

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

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

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

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

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

Wert Probe = bestimmter Wert Probe * K

Probe (Beispiel) = $3,0 \% * 1,2 = 3,6 \%$

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

Hinweis

Innereien, insbesondere Niere und Leber, weisen pro Gewichtsanteil aufgrund einer höheren Zellzahl einen entsprechend höheren DNA-Anteil als Muskelfleisch auf. Dies kann bei der Berechnung des prozentualen Spezies-Anteils zu einer „Über“quantifizierung des Tieres, aus dem die Innereien stammen, führen. Bei Fleischprodukten mit Innereienteilen > 5 % ist daher Vorsicht bei der Angabe der Speziesanteile geboten.

Weitere Informationen

- Validierungsdaten
- Microsoft Excel Berechnungsvorlage
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)

Technischer Support

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

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



Description

The test detects the relative beef DNA amount to the total animal DNA content in meat samples. Therefore the kit contains two PCR systems, one for detection of a beef specific gene (**Bos** detection gene) and one for the detection of an animal gene (**Ref** reference gene). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.).

Limit of Detection

The beef specific PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA-copies. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA-preparation and DNA-content. The limit of quantitation depends on the concentration of the sample DNA used in the analysis. For example, if 50,000 target-sequence copies of the reference gene are present, the relative quantitation limit for beef DNA is 0.04 %.

Cross reactivity

Cross reactivity was observed with DNA extracts from *Bison sp.* (100 %) and Water buffalo (*Bubalis arnee*) with 0.6%.

DNA-preparation

For DNA-preparation of meat samples the use of SureFood® PREP Basic is recommended.

Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Ref Reaction Mix	2 x 450 µl	Yellow
2	Bos Reaction Mix	2 x 450 µl	Yellow
3	Taq Polymerase	1 x 15 µl	Red
4	Dilution Buffer	1 x 1300 µl	White
5	Standard DNA	1 x 25 µl	Dark Blue
6	Positive Control (100% beef)	1 x 25 µl	Light Blue

Store all reagents at -20°C and protected from light.

Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, capillaries, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

Protocol

1. Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples, controls and standards).

Reactions needed for the reference-gene detection:

For each run: 5 reactions for the standard curve
3 reactions for controls (1x no-template and 2x Positive Control)

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

Reactions needed for the beef detection:

For each run: 5 reactions for the standard curve
3 reactions for controls (1x no-template and 2x Positive Control)

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

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix by vortexing and centrifuge before opening and use. The tube of the Taq Polymerase should be kept at -20°C and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Ref Reaction Mix or Bos Reaction Mix	18.0 µl	198.0 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	18.1 µl	199.1 µl

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

2. Setup

	Blockcycler/LightCycler® 480	Rotorcyclcr
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 45 10 sec, 95°C 15 sec, 62°C 30 sec, 65°C	1 min, 95°C 45 5 sec, 95°C 10 sec, 62°C 15 sec, 65°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: TAMRA Passive Reference: none	LightCycler® Channel: 530/610 or F1/F2 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: FAM (Green)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

3. Preparation of the standard DNA dilutions

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

standard	dilution	copy number per µl	final copy number per reaction*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	100,000 copies	200,000 copies
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1	10,000 copies	20,000 copies
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2	1000 copies	2000 copies
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3	100 copies	200 copies
S5	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S4	10 copies	20 copies

***Note:** 2 µl of standard DNA are used for each calibration point. The final copy number per reaction is to be entered in the analysis software of the real-time PCR detection system.

If the diluted DNA standards (S1 to S5) are not immediately used, store them at -20°C. The dilutions are stable up to two months at -20°C. Before use allow the reagents to thaw, mix them on a vortex and centrifuge carefully before opening and use.

4. Preparation of the PCR-mix

- Pipette 18 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 2 µl of sample DNA into the designated tubes/wells or capillaries.
- Pipette 2 µl of the Positive Control and the standard dilutions into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates or capillaries into the PCR instrument and start the run according to the setup.

Interpretation of results

The calculation for both reaction systems (**Ref**, **Bos**) has to be made separately. Mark the standards, the controls and the samples for the specific system (**Bos**) and make the evaluation according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. Repeat the same procedure for the reference gene system (**Ref**). The value for the slope of the standard curve has to be between -3.1 and -3.6 and the correlation coefficient $R^2 > 0.98$. In case of different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

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

Sample beef (Bos)	1350 copies	Positive Control beef (Bos)	900 copies
Sample animal (Ref)	45,000 copies	Positive Control animal (Ref)	1100 copies

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

beef DNA content = **Bos** copy number * 100 / **Ref** copy number

sample DNA **beef** content = $1350 * 100 / 45,000$ sample-DNA **beef** content = 3 %

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

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

$K = \text{true percentage of Positive Control} / \text{measured percentage of Positive Control}$

$K (\text{example}) = 100 \% / 81.8 \% = 1.2$

The calculated value for the sample is multiplied with K to obtain a corrected value.

percentage sample = measured percentage of sample * K sample (example) = $3.0 \% * 1.2 = 3.6 \%$

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

Note

Innards, particularly kidney or liver, show a higher DNA content per weight unit when compared to muscle tissue. This could lead to over-estimation of the species content of the animal from which the innards come from. For meat products with innards content >5 % care has to be taken when relative species contents are reported.

Product Information

- Validation Report
- Microsoft Excel template of calculation
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)

Technical Support

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

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

