

**SureFood® ANIMAL ID Cat & Dog (2 x 50 Reakt.)**

Art. Nr. S6012

Version 2.1

Beschreibung

Mit diesem Test wird DNA von Katze (*Felis catus*) und Hund (*Canis lupus familiaris*) nachgewiesen. 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

Der ANIMAL ID real-time PCR Test ist so ausgelegt, dass die DNA der zu bestimmenden Tierart in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 0,5 % nachweisbar ist.

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

DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation von Rohmaterialien wird das SureFood® PREP Basic Kit und für stark prozessierte Proben wird das SureFood® PREP Advanced Kit empfohlen.

Kit-Inhalt und Lagerung

1x	Cat Reaction Mix (1,1 ml)	(Code 1)
1x	Dog Reaction Mix (1,1 ml)	(Code 2)
1x	Taq Polymerase (11 µl)	(Code 3)
1x	Positive Control (200 µl)	(Code 4)

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 und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle je Probe. Die Inhibitionskontrolle kann durch eine zusätzliche Reaktion, bei der die Positive Control zur Proben-DNA pipettiert wird, realisiert werden. Durch einen Vergleich mit der Reaktion, bei der nur die Positive Control enthalten ist, können PCR Inhibitionen erkannt werden.

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%)
Cat Reaction Mix oder Dog Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler/LightCycler®480	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	10 sec, 95°C	5 sec, 95°C
Annealing	15 sec, 48°C	10 sec, 48°C
Extension (CYCLE)	30 sec, 55°C	15 sec, 55°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 des PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten, Kapillaren).
- 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 PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen. Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im tierartenspezifischen System zeigt. Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im tierartenspezifischen System zeigt. Bei einem **negativen** Ergebnis einer Probe muss die zugehörige Inhibitionskontrolle **positiv** sein. Andernfalls sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

Hinweis: Bei Anwesenheit von DNA aus mehr als einer Tierart kann das Mischungsverhältnis der DNAs einen kompetitiven Einfluss auf die Intensität der absoluten Fluoreszenz haben. Mit abnehmendem relativem Gehalt der zu bestimmenden DNA in einem Gemisch tierischer DNAs sinkt das Fluoreszenzniveau der Amplifikationskurve ab.

Weitere Informationen

- Validierungsdaten

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: sales@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com



Description

The test detects DNA from cat (*Felis catus*) and dog (*Canis lupus familiaris*). 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 ANIMAL ID real-time PCR is developed for the detection of cat- and dog-DNA in muscle meat mixture at a relative amount of 0.5 %. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

DNA-preparation

For DNA-preparation of meat material the use of SureFood® PREP Basic and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced is recommended.

Kit components and storage

1x	Cat Reaction Mix (1.1 ml)	(Code 1)
1x	Dog Reaction Mix (1.1 ml)	(Code 2)
1x	Taq Polymerase (11 µl)	(Code 3)
1x	Positive Control (200 µl)	(Code 4)

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 and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control, extraction control and inhibition control for each sample. The test for the presence of inhibitors can be realized by an addition of the Positive Control to the sample DNA (inhibition control). By comparing this reaction with the Positive Control, possible PCR inhibitors can be identified.

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)
Cat Reaction Mix or Dog 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. Setup

	Blockcycler/LightCycler®480	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	10 sec, 95°C	5 sec, 95°C
Annealing	15 sec, 48°C	10 sec, 48°C
Extension (CYCLE)	30 sec, 55°C	15 sec, 55°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)
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 PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- 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 or capillaries and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries into the PCR instrument and start the run according to the setup.

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 need to give the correct results. A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the animal species system.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the animal species system. In case of a **negative** result the inhibition control of the sample must be **positive**. Is this not the case the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

Note: If the sample contains more than one animal species the DNA mixture can have a competitive influence on the absolute fluorescence. With decreasing concentration of the determinant DNA in a mixture of animal DNAs the fluorescence level of the amplification curve is falling.

Product Information

- Validation Report

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: sales@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

