

**Beschreibung**

Mit diesem Test wird Rind-DNA (*Bos taurus*) nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für tierische DNA ausgestattet (IAAC). Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm und 553 nm detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung wurde auf dem Roche LightCycler® 2.0*, Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 und Agilent Mx3005P durchgeführt.

Nachweisgrenze

Der ANIMAL ID Beef IAAC real-time PCR Test ist so ausgelegt, dass Rind-DNA in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 0,1 % 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

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

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

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (FAM und VIC/HEX Kanal)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Kapillaren, Platten, Gefäße, 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 und eine Extraktionskontrolle. Der Reaction Mix enthält eine interne Kontrolle für den Nachweis von allgemeiner tierischer DNA und eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion. Beide Kontroll-Reaktionen werden im gleichen Kanal gemessen.

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

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

*Hinweis: Für Benutzer des Roche LightCycler® 2.0 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) benutzt werden.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler/LightCycler® 480	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 35
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase <u>Nachweisystem Rind:</u> Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ LightCycler® 2.0* 530-none Rotor-Gene Q Green LC480 I 483 nm, 533 nm LC480 II 465 nm, 510 nm <u>allgemeiner Nachweis tierischer DNA und interne Amplifikationskontrolle:</u> Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ LightCycler® 2.0* 560-none Rotor-Gene Q Yellow LC480 I 523 nm, 568 nm LC480 II 533 nm, 580 nm	
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.

***Hinweis:** Für Benutzer des Roche LightCycler® 2.0 ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit II (Art. Nr. F4010) benutzt werden.

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.

Im FAM-Kanal wird der Parameter Rind detektiert. Im VIC/HEX-Kanal wird ein möglicher tierischer DNA-Anteil in der Probe nachgewiesen sowie bei nicht Vorhandensein von Tier-DNA wird eine interne Amplifikationskontrolle detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für Rind bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter Rind bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Nachweissystem zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC-Kanal) **positiv** ist.

Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im VIC-Kanal deutlich vor dem Signal der internen Amplifikationskontrolle (erkennbar in der Negativkontrolle ohne DNA-Zugabe) wird das generelle Vorhandensein von tierischer DNA in der Probe nachgewiesen.

Zeigt das interne Signal (VIC-Kanal) einen CP-Wert im Bereich der Negativkontrolle (ohne DNA Zugabe), dann wird die PCR zwar nicht inhibiert, jedoch liegt entweder gar keine oder sehr wenig tierische DNA vor.

Sollte die Probe im FAM-Nachweissystem **negativ** sein und auch das Signal in der internen VIC-Kontrolle negativ sein, 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. Je geringer der relative Gehalt der zu bestimmenden DNA in einem Gemisch tierischer DNAs ist, desto geringer ist das Fluoreszenzniveau der Amplifikationskurve.

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



Description

The test detects beef DNA (*Bos taurus*). Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for animal DNA (IAAC). The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at 522 nm and 553 nm at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 2.0*, Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 and Agilent Mx3005P.

Limit of Detection

The ANIMAL ID Beef IAAC real-time PCR is developed for the detection of beef-DNA in muscle meat mixtures at a relative amount of 0.1 %. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

DNA-preparation

For DNA-preparation of raw 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

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

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

Additionally required equipment and materials

- Real-time PCR instrument, equipped with two detection channels (FAM and VIC/HEX channel)
- Real-time PCR consumables (capillaries, plates, tubes, foils, 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 and extraction control. The Reaction Mix includes an internal control for animal DNA and an internal amplification control (inhibition control) for each reaction. Both control reactions are detected in the same channel.

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)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20.0 µl	220.0 µl

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

*note: A Color Compensation is necessary for users of the Roche LightCycler® 2.0. The SureCC Color Compensation kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

2. Setup

	Blockcyler/LightCycler® 480	Rotorcyler
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	
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase <u>Detection system beef:</u> Diverse devices FAM-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LightCycler® 2.0* 530-none LC480 I 483 nm, 533 nm LC480 II 465 nm, 510 nm <u>universal animal detection and internal amplification control:</u> Diverse devices VIC/HEX- channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LightCycler® 2.0* 560-none LC480 I 523 nm, 568 nm LC480 II 533 nm, 580 nm	
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/capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells/capillaries.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells/capillaries.
- Centrifuge all tubes/plates/capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates/capillaries into the PCR instrument and start the run according to the setup.

***note:** A Color Compensation is necessary for users of the Roche LightCycler® 2.0. The SureCC Color Compensation kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

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.

Beef-DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC or HEX-channel it is possible to detect animal DNA in the sample as well as the amplification control in a sample with no animal DNA inside.

A sample is stated **positive** for beef, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for beef, if the sample DNA shows no amplification in the FAM-channel and if the internal control (VIC-channel) of the sample is positive.

If the internal control (VIC-channel) of the sample DNA is detected significantly before the signal of the negative control (master-mix without DNA), the sample contains animal DNA. Is the CP-value of the internal control (VIC-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 and the internal signal are **negative** the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample DNA 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. 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.

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

