

**SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC (100 Reakt.)** | Art. Nr. S6121

Version 2.1

Beschreibung

Mit diesem Test wird Rind- (*Bos taurus*), Schaf- (*Ovis aries*) und Ziegen-DNA (*Capra hircus*) nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für tierische DNA (IAAC) ausgestattet. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 522 nm, 553 nm, 610 nm und 670 nm (FAM, VIC, ROX und Cy5) detektieren können, verwendet werden. Die Technische Gerätevalidierung wurde auf dem Roche LightCycler® 480 II*, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 und Agilent Mx3005P durchgeführt.

Nachweisgrenze

Die SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC real-time PCR ist so ausgelegt, dass Rinder-, Schaf- und Ziegen-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.

Kreuzreaktionen

Das Schaf-Nachweissystem weist eine Querempfindlichkeit zu Springbock (*Antidorcas marsupialis*) auf.

DNA-Präparation

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

Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

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

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (522 nm, 553 nm, 610 nm, 670 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (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 Master-Mix enthält eine interne Kontrolle für den Nachweis von allgemeiner tierischer DNA und eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion. Beide Kontrollreaktionen 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.

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® 480 I und II ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieser Geräte muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) benutzt werden.

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler / LightCycler® 480*	Rotor-Gene Q
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 Nachweissystem Rind: Diverse Geräte FAM-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LC480 I 483 nm, 533 nm LC480 II 465 nm, 510 nm Nachweissystem Schaf: Diverse Geräte VIC/HEX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LC480 I 523 nm, 568 nm LC480 II 533 nm, 580 nm Nachweissystem Ziege: Diverse Geräte ROX-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Orange LC480 I 483 nm, 610 nm LC480 II 533 nm, 610 nm allgemeiner Nachweis tierischer DNA und interne Amplifikationskontrolle (IAC): Diverse Geräte Cy5-Kanal, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red LC480 I 615 nm, 670 nm LC480 II 618 nm, 660 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).
- 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® 480 I und II ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieser Geräte muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) 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, im VIC-Kanal der Parameter Schaf und im ROX-Kanal der Parameter Ziege detektiert. Im Cy5-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 **positiv** für den jeweiligen Parameter (Rind/Schaf/Ziege) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (Rind/Schaf/Ziege) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (Cy5 Kanal) **positiv** ist (siehe dazu auch Tabelle unten).

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis
FAM-Kanal Rind	VIC/HEX -Kanal Schaf	ROX-Kanal Ziege	Cy5-Kanal ¹ Tier + IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv	Rind-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	Schaf-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	Ziege-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Tier-DNA² nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar ³

¹ Erfolgt die Detektion der Proben-DNA im Cy5-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.

² Zeigt das interne Signal (Cy5) 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.

³ Sollte eine Probe in allen Kanälen inklusive dem Cy5-Kanal **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 (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*) DNA. 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 four fluorescence emissions at 522 nm, 553 nm, 610 nm and 670 nm (FAM, VIC, ROX and Cy5) at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II*, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 and Agilent Mx3005P.

Limit of Detection

The SureFood® ANIMAL ID 4plex Beef/Sheep/Goat+IAAC real-time PCR is developed for the detection of beef, sheep and goat DNA in muscle meat mixture at a relative amount of 0.1 %. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

Cross reactivity

Cross reactivity was observed with DNA extracts from springbok (*Antidorcas marsupialis*) in the detection system for sheep.

DNA-preparation

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

Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 11 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

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

Additionally required equipment and materials

- Real-time PCR device, equipped with 4 detection channels (522 nm, 553 nm, 610 nm, 670 nm)
- Real-time PCR consumables (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 master-mix includes an internal control for universal animal DNA and an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

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.

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 off the Roche LightCycler® 480 I and II. For the Color Compensation of such devices the SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must to be used.

2. Setup

	Blockcycler / LightCycler® 480*	Rotor-Gene Q
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 Detection system beef: Diverse devices FAM-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Green LC480 I 483 nm, 533 nm LC480 II 465 nm, 510 nm Detection system sheep: Diverse devices VIC/HEX-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Yellow LC480 I 523 nm, 568 nm LC480 II 533 nm, 580 nm Detection system goat: Diverse devices ROX-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Orange LC480 I 483 nm, 610 nm LC480 II 533 nm, 610 nm universal animal detection and internal amplification control: Diverse devices Cy5-channel, Quencher: BHQ Rotor-Gene Q Red LC480 I 615 nm, 670 nm LC480 II 618 nm, 660 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.
- 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 and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes and close them. Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the PCR instrument and start the run according to the setup.

*note: A Color Compensation is necessary for users of the Roche LightCycler® 480 I and II. For the Color Compensation of such devices the SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must to be used.

Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. The results of the control reactions have to be correct.

Beef DNA is detected in the FAM-channel, sheep DNA is detected in the VIC-channel and goat DNA is detected in the ROX-channel. In the Cy5-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.

A sample is stated **positive** for the respective parameter (beef/sheep/goat), if the sample DNA shows amplification in the respective channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter (beef/sheep/goat), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the internal signal (Cy5-channel) of the sample is **positive** (see also table below).

result in the respective channel				
FAM - channel beef	VIC/HEX - channel sheep	ROX - channel goat	Cy5 - channel ¹ animal + IAC	result
positive	negative	negative	positive	beef DNA detected
negative	positive	negative	positive	sheep DNA detected
negative	negative	positive	positive	goat DNA detected
negative	negative	negative	positive	animal DNA² detected
negative	negative	negative	negative	Invalid ³

¹ If the signal of the internal control (Cy5-channel) of the sample DNA is detected significantly before the signal of the negative control (master-mix without DNA) the sample contains animal DNA.

² Is the cp-value of the internal control (Cy5-channel) in the range of the negative control the sample contains no PCR-inhibiting substances but only a low amount or no animal DNA.

³ In the case of a negative result in all channels including the Cy5-channel the sample contains PCR inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample 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. 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

