

**CONGEN**

**SureFood<sup>®</sup> FISH ID**  
**Katsuwonus pelamis IAAC**  
**(R&D Version)**

Art. No. S6314

50 rxn

User Manual



September 2018

 **Inhalt** /  **Content**

1.	Allgemeines .....	2
1.1	Beschreibung .....	2
1.2	Nachweisgrenze .....	2
1.3	DNA-Präparation .....	2
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung .....	2
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	2
1.6	Geräteeinstellungen .....	3
2	Qualitative Analyse .....	3
2.1	Protokoll .....	3
2.1.1	Herstellen des Master-Mix .....	3
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	3
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	4
3	Weitere Informationen .....	4
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	4
3.2	Technischer Support .....	4
3.3	Vertrieb und Bestellung .....	4
1	General Information .....	5
1.1	Description .....	5
1.2	Limit of Detection .....	5
1.3	DNA-preparation .....	5
1.4	Kit components and storage .....	5
1.5	Additionally required equipment and materials .....	5
1.6	Setup .....	6
2	Qualitative Analysis .....	6
2.1	Protocol .....	6
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	6
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	6
2.2	Interpretation of results .....	7
3	Further Information .....	7
3.1	Product Information .....	7
3.2	Technical Support .....	7
3.3	Distribution and ordering .....	7

## 1. Allgemeines

### 1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird DNA des echten Bonito (*Katsuwonus pelamis*) nachgewiesen. Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA (IAAC) ausgestattet. 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<sup>1</sup>.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® FISH ID Katsuwonus pelamis IAAC (R&D Version) real-time PCR ist so ausgelegt, dass DNA des echten Bonito in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von 1 % nachweisbar ist. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

### 1.3 DNA-Präparation

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

### 1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 10 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

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

### 1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFood® PREP Basic oder SureFood® PREP Advanced)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (522 nm und 553 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

<sup>1</sup> Für die Benutzung 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) verwendet werden.

## 1.6 Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler/MIC/LightCycler® 480</b>	<b>Rotorgene</b>
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	35	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	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplarisch)	Detection: End of Extension Phase  Nachweissystem <i>Katsuwonus pelamis</i> : Diverse Geräte <b>FAM</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  allgemeiner Nachweis tierischer DNA und interne Amplifikationskontrolle (IAC): Diverse Geräte <b>VIC/HEX</b> -Kanal, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm	
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: <a href="http://www.congen.de/unternehmen/download">http://www.congen.de/unternehmen/download</a>		

## 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 empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

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:

<b>Komponenten des Master-Mix</b>	<b>Menge pro Reaktion</b>	<b>10 Reaktionen (zusätzlich 10%)</b>
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix im Vortex 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 (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 real-time PCR Gerät einsetzen, entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

September 2018

## 2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analysen-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 *Katsuwonus pelamis* detektiert. Im VIC-Kanal wird ein möglicher tierischer DNA-Anteil in der Probe nachgewiesen. Ist keine tierische DNA in der Probe vorhanden, wird eine interne Amplifikationskontrolle detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den Parameter *Katsuwonus pelamis* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im FAM-Kanal zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter *Katsuwonus pelamis* bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im FAM-Kanal 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) 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.

## 3 Weitere Informationen

### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Validierungsdaten

### 3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

### 3.3 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 test detects skipjack (*Katsuwonus pelamis*) DNA. Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for vertebrates 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<sup>2</sup>.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFood® FISH ID Katsuwonus pelamis IAAC (R&D Version) real-time PCR is developed for the detection of skipjack in muscle meat mixture at a relative amount of 1 %. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

### 1.3 DNA-preparation

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

### 1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 10 µl	Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

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

### 1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFood® PREP Basic or SureFood® PREP Advanced)
- real-time PCR instrument with four detection channels (522 nm and 553 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps) pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

<sup>2</sup> note: For the use of the Roche LightCycler® 2.0 a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit II (Art. No. F4010) must be used for the color compensation of such devices.

**1.6 Setup**

	<b>Blockcycler/MIC/LightCycler® 480 II</b>	<b>Rotorgene</b>
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	35	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	Maximum
Fluorescence Detection Setup (exemplary)	Detection: End of Extension Phase  Detection System <i>Katsuwonus pelamis</i> : Various devices <b>FAM</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 465 nm - 510 nm  Universal animal detection and internal amplification control: Various devices <b>VIC/HEX</b> -channel, Quencher: BHQ LightCycler 480 II 533 nm - 580 nm	
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: <a href="http://www.congen.de/en/company/downloads">http://www.congen.de/en/company/downloads</a>		

**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). Recommended control reactions: negative control, positive control and extraction control. The master-mix includes 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. 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:

<b>Components for master-mix</b>	<b>Amount per reaction</b>	<b>10 reactions (with 10% excess)</b>
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 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 or 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 or capillaries.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries.
- Centrifuge all tubes/wells or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/wells or capillaries into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

September 2018

## 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 need to give the correct results.

*Katsuwonus pelamis* DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC-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 *Katsuwonus pelamis*, if the sample DNA shows amplification in the FAM-channel. A sample is stated **negative** for *Katsuwonus pelamis*, 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 significant, 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 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.

## 3 Further Information

### 3.1 Product Information

- Validation Report

### 3.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

### 3.3 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)

