

CONGEN

SureFood® FISH ID
Oncorhynchus mykiss IAAC
(R&D Version)

Art. No. S6302
50 rxn

User Manual



September 2019

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	3
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	3
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Qualitative Analyse	5
2.1	Protokoll	5
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	5
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	5
2.2	Interpretation der Ergebnisse	6
3	Weitere Informationen	6
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	6
3.2	Technischer Support	6
3.3	Vertrieb und Bestellung	6



Content

1	General Information	7
1.1	Description	7
1.2	Limit of Detection	7
1.3	DNA-preparation	7
1.4	Kit components and storage	7
1.5	Additionally required equipment and materials	7
1.6	Setup	8
1.7	Detection channel Set-up	8
2	Qualitative Analysis	9
2.1	Protocol	9
2.1.1	Preparation of the master-mix	9
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	9
2.2	Interpretation of results	10
3	Further Information	10
3.1	Product Information	10
3.2	Technical Support	10
3.3	Distribution and Ordering	10

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® FISH ID Oncorhynchus mykiss IAAC (R&D Version) ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz von der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*).

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle sowie mit einem internen allgemeinen Nachweis für Wirbeltier DNA (IAAC) ausgestattet. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® FISH ID Oncorhynchus mykiss IAAC (R&D Version) real-time PCR ist so ausgelegt, dass DNA der Regenbogenforelle in einem Muskelfleischgemisch ab einem relativen Anteil von $\leq 0,1$ % 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	1 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 10 µl	Rot
3	Positive Control	1 x 100 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 Art. Nr. S1052 oder SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053)
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm und 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

SureFood® FISH ID *Oncorhynchus mykiss* IAAC (R&D Version) (50 rxn)

Art. Nr. S6302

September 2019

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler / R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler / LTF MyGo Pro
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	Maximum

1.7 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	VIC	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	465-510	+	
	IAAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	465-510	+	
	IAAC	540-580	+	

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: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positivkontrolle. Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen *Oncorhynchus mykiss*-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen 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 µl	220 µl

Master-Mix 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 Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter *Oncorhynchus mykiss* detektiert. Im VIC/HEX-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 als **positiv** für den Parameter *Oncorhynchus mykiss* bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den Parameter *Oncorhynchus mykiss* bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Die interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) muss im VIC/HEX-Kanal **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle sein.

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

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

Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-DNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem für *Oncorhynchus mykiss* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

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

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsdaten auf Anfrage

3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an 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
www.r-biopharm.com



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® FISH ID *Oncorhynchus mykiss* IAAC (R&D Version) is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of a specific rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) DNA sequence.

Each reaction contains an internal amplification control and an internal detection assay for vertebrates DNA (IAAC). If the DNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® FISH ID *Oncorhynchus mykiss* IAAC (R&D Version) real-time PCR is developed for the detection of rainbow trout in muscle meat mixture at a relative amount of $\leq 0.1\%$.

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	1 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 10 µl	Red
3	Positive Control	1 x 100 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 No. S1052 or SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortexmixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

SureFood® FISH ID *Oncorhynchus mykiss* IAAC (R&D Version) (50 rxn)

Art. No. S6302

September 2019

1.6 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler & LTF MyGo Pro
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	Maximum

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FAM	+	
	IAAC	VIC	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	green	+	
	IAAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	465-510	+	
	IAAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	465-510	+	
	IAAC	540-580	+	

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) for the specific PCR assay as well as for the inhibition control.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, positive control. The reaction mix contains an internal amplification control (IAC) per reaction.

Reactions needed for the qualitative *Oncorhynchus mykiss* detection:

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1x positive control)

For each sample: at least 1 reaction for 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 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 of the 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 µl	220 µl

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.
- 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 and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

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 have to show the correct results.

Oncorhynchus mykiss DNA is detected in the FAM-channel. In the VIC/HEX-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 *Oncorhynchus mykiss*, if the sample DNA shows amplification in the detection system.

A sample is stated **negative** for *Oncorhynchus mykiss*, if the sample DNA shows no amplification in the detection system. The internal amplification control (inhibition control) of the sample has to be **positive** with a shift in Cp-Value ≤ 2 compared to the negative control in the VIC/HEX-channel.

If the internal control signal in the VIC/HEX-channel of the sample DNA is detected significantly before the signal of the negative control the sample contains animal DNA.

Is the Cp-value of the internal control in the VIC/HEX-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 in the VIC/HEX-channel shows **no amplification** or a shift in Cp-value > 2 compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. Alternatively the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific *Oncorhynchus mykiss* PCR assay.

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

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices
(Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Data upon request

3.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to 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
www.r-biopharm.com

