

CONGEN

SureFood[®] ALLERGEN 4plex Cereals

Art. No. S7006
100 rxn

User Manual



November 2019

 **Inhalt**

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	Nachweisgrenze	3
1.3	DNA-Präparation	4
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien	4
1.6	Geräteeinstellungen	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitative Analyse	6
2.1	Protokoll	6
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	6
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	6
2.2	Interpretation der Ergebnisse	7
3	Weitere Informationen	8
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
3.2	Technischer Support	8
3.3	Vertrieb und Bestellung	8



Content

1	General Information	9
1.1	Description	9
1.2	Limit of Detection	9
1.3	DNA-preparation	10
1.4	Kit components and storage	10
1.5	Additionally required equipment and materials	10
1.6	Setup	10
1.7	Detection channel Set-up	11
2	Qualitative Analysis	12
2.1	Protocol	12
2.1.1	Preparation of the master-mix	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	12
2.2	Interpretation of results	13
3	Further Information	14
3.1	Product Information	14
3.2	Technical Support	14
3.3	Distribution and Ordering	14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von Weizen (*Triticum*), Gerste (*Hordeum vulgare*) und Roggen (*Secale cereale*).

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAC) 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 vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 1 mg / kg bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von der Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und dem DNA-Gehalt.

Die SureFood® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Advanced Kit (Art. Nr. S1053), Protokoll 1 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 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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	Weizen	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Gerste	ROX	+	
	Roggen	Cy5	+	
Agilent AriaDx	Weizen	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Gerste	ROX	+	
	Roggen	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	Weizen	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	Gerste	ROX	None	
	Roggen	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	Weizen	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	Gerste	ROX	+	
	Roggen	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Weizen	green	+	
	IAC	yellow	+	
	Gerste	orange	+	
	Roggen	red	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Weizen	green	+	
	IAC	yellow	+	
	Gerste	orange	+	
	Roggen	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Weizen	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	Gerste	533-610	+	
	Roggen	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Weizen	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	540-580	+	
	Gerste	540-610	+	
	Roggen	610-670	+	

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 Weizen-, Gerste- und Roggen-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.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 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 Reaktionsgefäße.
- 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 Weizen, im ROX-Kanal der Parameter Gerste und im Cy5-Kanal der Parameter Roggen detektiert (siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

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

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

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 Weizen, Gerste oder Roggen mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal Weizen	ROX-Kanal Gerste	Cy5-Kanal Roggen	VIC/HEX-Kanal IAC	
positiv	negativ	negativ	positiv	Weizen-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	Gerste-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	Roggen-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

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

r-biopharm®



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific wheat (*Triticum*), barley (*Hordeum vulgare*) and rye (*Secale cereale*) DNA sequences.

Each reaction contains an internal amplification control (IAC). 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 performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX, 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, R-Biopharm RIDA®CYCLER, Agilent AriaDx and Agilent Mx3005P.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN 4plex Cereals PCR has a limit of detection of ≤ 1 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1.

The limit of detection of the complete method (DNA extraction and real-time PCR) depends on sample matrix, processing grade, DNA-preparation and DNA-content.

The SureFood® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053), protocol 1 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 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at –20°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.

Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053)
- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
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

1.7 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	wheat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	barley	ROX	+	
	rye	Cy5	+	
Agilent AriaDx	wheat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	barley	ROX	+	
	rye	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	wheat	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	barley	ROX	None	
	rye	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	wheat	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	barley	ROX	+	
	rye	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	wheat	green	+	
	IAC	yellow	+	
	barley	orange	+	
	rye	red	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	wheat	green	+	
	IAC	yellow	+	
	barley	orange	+	
	rye	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	wheat	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	533-580	+	
	barley	533-610	+	
	rye	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	wheat	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	540-580	+	
	barley	540-610	+	
	rye	610-670	+	

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 wheat, barley and rye detection:

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

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 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.

Wheat DNA is detected in the FAM-channel, barley DNA is detected in the ROX-channel and rye DNA is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the negative control.

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 wheat, barley or rye PCR assay.

Result in the respective channel				Interpretation
FAM channel wheat	ROX channel barley	Cy5 channel rye	VIC/HEX channel IAC	
positive	negative	negative	positive	wheat DNA detected
negative	positive	negative	positive	barley DNA detected
negative	negative	positive	positive	rye DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid

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 Report 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

