

CONGEN

SureFood® ALLERGEN Walnut

Art. No. S3607
100 rxn

User Manual



January 2024

 **Inhalt**

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Allgemeines | 3 |
| 1.1 | Beschreibung | 3 |
| 1.2 | Nachweis- und Bestimmungsgrenze | 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 | Quantitative Analyse | 8 |
| 3.1 | Protokoll | 8 |
| 3.1.1 | Herstellen des Master-Mix | 8 |
| 3.1.2 | Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen | 8 |
| 3.1.3 | Herstellen des real-time PCR-Mix | 9 |
| 3.2 | Interpretation der Ergebnisse | 9 |
| 4 | Weitere Informationen | 10 |
| 4.1 | Weitere Dokumente und Hilfsmittel | 10 |
| 4.2 | Technischer Support | 10 |
| 4.3 | Vertrieb und Bestellung | 10 |



Content

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | General Information | 11 |
| 1.1 | Description | 11 |
| 1.2 | Limit of Detection and Limit of Quantification | 11 |
| 1.3 | DNA-preparation | 12 |
| 1.4 | Kit components and storage | 12 |
| 1.5 | Additionally required equipment and materials | 12 |
| 1.6 | Setup | 12 |
| 1.7 | Detection channel Set-up | 13 |
| 2 | Qualitative Analysis | 14 |
| 2.1 | Protocol | 14 |
| 2.1.1 | Preparation of the master-mix | 14 |
| 2.1.2 | Preparation of the real-time PCR-mix | 14 |
| 2.2 | Interpretation of results | 15 |
| 3 | Quantitative Analysis | 16 |
| 3.1 | Protocol | 16 |
| 3.1.1 | Preparation of the master-mix | 16 |
| 3.1.2 | Preparation of the standard DNA dilutions | 16 |
| 3.1.3 | Preparation of the real-time PCR-mix | 17 |
| 3.2 | Interpretation of results | 17 |
| 4 | Further Information | 18 |
| 4.1 | Product Information | 18 |
| 4.2 | Technical Support | 18 |
| 4.3 | Distribution and Ordering | 18 |

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® ALLERGEN Walnut ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen und/oder quantitativen Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz der Gattung Walnüsse (*Juglans regia* und *Juglans nigra*) gemäß Verordnung (EU) 1169/2011.

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.

Für die quantitative Bestimmung werden das Vergleichsmaterial SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Art. Nr. S3301) mit einem Gehalt von 40 mg Walnuss / kg Lebensmittel und das Nachweis-System für Walnuss inklusive Standardreihe verwendet.

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. Die technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, LTF MyGo Pro, Agilent AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

Generell können alle homogenen Lebensmittelproben für die quantitative Analyse eingesetzt werden. Für die quantitative Bestimmung von Gehalten in Tupfern, Schwämmen und inhomogenen Flüssigkeiten ist das vorliegende Verfahren nicht geeignet.

Das Verfahren ist für eine quantitative Bestimmung von Gehalten zwischen 1 mg und 400 mg allergenem Bestandteil / kg Lebensmittel, unter Verwendung des SureFood® QUANTARD Allergen 40 mit einer Konzentration von 40 mg / kg, validiert.

1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die SureFood® ALLERGEN Walnut real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von $\leq 0,4$ mg / kg bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1.

Die Bestimmungsgrenze liegt bei 1 mg / kg bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens wurde der SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Matrix: Maismehl) zur Hilfe genommen. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) sind 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 der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053), Protokoll 1 oder SureFast® Mag PREP Food (Art. Nr. F1060) empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

| Kit Code | Reagenz | Menge | Deckelfarbe |
|----------|------------------|-------------|-------------|
| 1 | Reaction Mix | 2 x 1050 µl | Gelb |
| 2 | Taq Polymerase | 1 x 80 µl | Dunkelrot |
| 3 | Positive Control | 1 x 200 µl | Hellblau |
| 4 | Dilution Buffer | 1 x 1600 µl | Weiß |
| 5 | Standard DNA | 1 x 200 µl | Dunkelblau |

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 oder SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060)
- Referenzmaterial zur Quantifizierung (SureFood® QUANTARD Allergen 40, Art. Nr.: S3301)
- 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

1.6 Geräteeinstellungen

| | Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER | Rotorcycler & LTF MyGo Pro |
|--|---|-------------------------------|
| Initial Denaturation (HOLD) Cycles | 5 min, 95°C 45 | 1 min, 95°C 45 |
| 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 | Detektionskanal | Quencher | Bemerkung |
|------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|--|
| Agilent Mx3005P | Walnuss | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Agilent AriaDx / Mx | Walnuss | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Applied Biosystems 7500 | Walnuss | FAM | None | Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none. |
| | IAC | VIC | None | |
| Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus | Walnuss | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| LTF MyGo Pro | Walnuss | FAM | + | |
| | IAC | VIC | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | Walnuss | green | + | Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein. |
| | IAC | yellow | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | Walnuss | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | Walnuss | 465-510 | + | |
| | IAC | 533-580 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | Walnuss | 465-510 | + | |
| | IAC | 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 Walnuss-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.

Eine Probe wird als **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem mit Cp-Wert ≤ 35 zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt oder der ermittelte Cp-Wert > 35 beträgt. Die interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) muss **positiv** (VIC/HEX) mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle sein. 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 Walnuss mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Alternativ kann eine selbst gewählte Referenzprobe an der Nachweisgrenze zur Beurteilung der Probe herangezogen werden. Die Verwendung dieser Referenzprobe erfolgt außerhalb der Qualitäts- und Bewertungsrichtlinien von CONGEN.

Generell:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Tests vorliegt oder dass andere Allergie-auslösende Substanzen wie z.B. Proteine oder Lipide, in einer Probe enthalten sein können.

3 Quantitative Analyse

3.1 Protokoll

3.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Standardkurve als Positivkontrolle und für die Quantifizierung. Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den Walnuss-Nachweis:

5 Reaktionen für die Standardkurve

2 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle)

2 Reaktionen für das Vergleichsmaterial (SureFood® QUANTARD Allergen 40 DNA)

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.

3.1.2 Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Standardkurven für Walnuss wird die Standard DNA (**Code 5**) unverdünnt verwendet und in 1:10-Schritten in Dilution Buffer (**Code 4**) verdünnt. Insgesamt werden 4 Verdünnungen benötigt. Es werden 4 Reaktionsgefäße (markiert mit S2 bis S5) vorbereitet und mit je 45 µl Dilution Buffer befüllt.

Nach folgender Tabelle sind die Verdünnungen herzustellen:

| Standard | Verdünnungen | Kopienanzahl je µl | Gesamtkopienanzahl je Reaktion [#] |
|----------|---|--------------------|---|
| S1 | Standard DNA unverdünnt | 100.000 Kopien | 500.000 Kopien |
| S2 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1 | 10.000 Kopien | 50.000 Kopien |
| S3 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2 | 1.000 Kopien | 5.000 Kopien |
| S4 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3 | 100 Kopien | 500 Kopien |
| S5 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S4 | 10 Kopien | 50 Kopien |

[#] **Hinweis:** Es werden 5 µl DNA im Reaktionsansatz verwendet. Die Gesamtkopienanzahl je Reaktion ist in das Setup File des Softwareprogramms des real-time PCR Gerätes einzutragen.

3.1.3 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 des extrahierten SureFood® QUANTARD Allergen 40 und der Standard-Verdünnungen 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.

3.1.4 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.

Eine Probe wird als **positiv** bewertet und kann quantifiziert werden, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem mit Cp-Wert ≤ 35 zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt oder der ermittelte Cp-Wert > 35 beträgt. Die interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) muss **positiv** (VIC/HEX) mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle sein. 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 Walnuss mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

Für die Quantifizierung werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

Generell:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Tests vorliegt oder dass andere Allergie-auslösende Substanzen wie z.B. Proteine oder Lipide, in einer Probe enthalten sein können.

Für die Umrechnung der Ergebnisse in mg allergener Bestandteil/ kg Lebensmittel wird folgende Formel eingeführt:

$$X[mg/kg] = \frac{10^{\left(\frac{Cp_{sample}}{s}\right)}}{10^{\left(\frac{Cp_{Quantard}}{s}\right)}} * C_{Quantard}$$

s = Steigung | c = Konzentration | Cp_{Quantard} = Ø aus Doppelbestimmung

Beispiel:

$$X[mg/kg] = \frac{10^{\left(\frac{28,5}{-3,251}\right)}}{10^{\left(\frac{29,2}{-3,251}\right)}} * 40 = 65,7 mg/kg$$

Cp_{sample} = 28,5 | Cp_{Quantard} = Ø 29,2 | s = - 3,251 | c = 40 mg/kg

Somit errechnet sich ein Anteil von **65,7 mg Walnuss / kg Lebensmittel** für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Microsoft Excel Berechnungsvorlage und detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Validierungsdaten auf Anfrage

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

4.3 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 Walnut is a real-time PCR for the direct, qualitative and / or quantitative detection of specific walnut (*Juglans regia* and *Juglans nigra*) DNA sequences according to directive (EC) 1169/2011.

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.

For the quantitative determination the use of the laboratory reference material SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Art. No. S3301) containing 40 mg walnut / kg food sample and a detection system including a standard series are required.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 2.0, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96, Bio Molecular Systems MIC, LTF MyGo Pro, AriaDx and Agilent Mx3005P.

In general this procedure is applicable for all homogenous food samples. The quantitative determination is inapplicable for swabs, sponges and inhomogeneous fluids/liquids.

The method is validated for quantitative determination of 1 mg to 400 mg allergenic substance / kg food sample using the reference material SureFood® QUANTARD Allergen 40 containing 40 mg allergenic substance / kg food sample.

1.2 Limit of Detection and Limit of Quantification

The SureFood® ALLERGEN Walnut PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1.

The limit of quantification is 1 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1.

The limit of detection and quantification were determined using the SureFood® QUANTARD Allergen 40 (matrix: corn flour). The limit of detection and quantification 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 or SureFast® Mag PREP Food (Art. No. F1060) is recommended.

1.4 Kit components and storage

| Kit Code | Reagent | Amount | Lid Color |
|-----------------|------------------|---------------|------------------|
| 1 | Reaction Mix | 2 x 1050 µl | Yellow |
| 2 | Taq Polymerase | 1 x 80 µl | Dark Red |
| 3 | Positive Control | 1 x 200 µl | Light Blue |
| 4 | Dilution Buffer | 1 x 1600 µl | White |
| 5 | Standard DNA | 1 x 200 µl | Dark 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 or SureFast® Mag PREP Food Art. No. F1060)
- reference material for quantification (SureFood® QUANTARD Allergen 40, Art. No.: S3301)
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm and 580 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 & LTF MyGo Pro |
|--|---|---|
| Initial Denaturation (HOLD) Cycles | 5 min, 95°C 45 | 1 min, 95°C 45 |
| 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 | Walnut | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Agilent AriaDx / Mx | Walnut | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| Applied Biosystems 7500 | Walnut | FAM | None | Check the passive reference option ROX is none. |
| | IAC | VIC | None | |
| Bio-Rad CFX96 / Dx / Opus | Walnut | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| LTF MyGo Pro | Walnut | FAM | + | |
| | IAC | VIC | + | |
| Qiagen Rotor-Gene Q | Walnut | green | + | Note: Please use only 0.1 ml reaction tubes. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels. |
| | IAC | yellow | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | Walnut | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | Walnut | 465-510 | + | |
| | IAC | 533-580 | + | |
| Roche cobas® z 480 Analyzer | Walnut | 465-510 | + | |
| | IAC | 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.

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 detection of walnut:

3 reactions for controls (1x negative 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.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the detection system or the obtained Cp value is ≤ 35 . High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system or the obtained Cp value is > 35 . The internal amplification control (IAC) of the sample has to be **positive** (VIC/HEX) 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 walnut PCR assay.

Alternatively, a self-selected reference sample at the detection limit can be used to assess the sample. This reference sample is used outside CONGEN's quality and evaluation guidelines.

In general:

Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like proteins or lipids for example.

3 Quantitative Analysis

3.1 Protocol

3.1.1 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, standard curve as positive control. The reaction mix contains an internal amplification control (IAC) per reaction.

Reactions needed for the quantitative detection of walnut:

5 reactions for the standard curve

2 reactions for controls (1x negative control, 1x extraction control)

2 reactions for reference material (SureFood® QUANTARD Allergen 40 DNA)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

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.

3.1.2 Preparation of the standard DNA dilutions

Use the undiluted Standard DNA (**Code 5**) and dilute the Standard DNA (**Code 5**) in 1:10 steps in Dilution Buffer (**Code 4**) in order to prepare different concentrations. Prepare a dilution series of 4 steps. Prepare 4 reaction tubes (labelled S2 to S5) and add 45 µl Dilution Buffer each.

The following procedure is recommended:

| Standard | Dilutions | Copy number per µl | Final copy number per reaction* |
|----------|--|--------------------|---------------------------------|
| S1 | Standard DNA undiluted | 100,000 copies | 500,000 copies |
| S2 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1 | 10,000 copies | 50,000 copies |
| S3 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2 | 1,000 copies | 5,000 copies |
| S4 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3 | 100 copies | 500 copies |
| S5 | 45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S4 | 10 copies | 50 copies |

*Note: 5 µl of standard DNA are used for each calibration point. The final copy number per reaction is to be entered in the analysis software of the real-time PCR detection system.

3.1.3 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 the SureFood® QUANTARD 40 Allergen DNA and the standard dilutions 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.

3.2 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.

A sample is stated **positive and can be quantified**, if the sample DNA shows amplification in the detection system or the obtained Cp value is ≤ 35 . High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control/standard DNA.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system or the obtained Cp value is > 35 . The internal amplification control (inhibition control) of the sample has to be **positive** (VIC/HEX) 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 walnut PCR assay.

For quantification mark the standards, controls and samples and make the evaluation according to the analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. The value for the slope of the standard curve has to be between -3.1 and -3.6 and the correlation coefficient $R^2 > 0.98$. In case of different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

In general:

Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like proteins or lipids for example.

For a final calculation of mg allergenic substance / kg food sample following formula is introduced:

$$X[mg/kg] = \frac{10^{\left(\frac{Cp_{sample}}{s}\right)}}{10^{\left(\frac{Cp_{Quantard}}{s}\right)}} * C_{Quantard}$$

s = slope | c = concentration | Cp_{Quantard} = Ø of double assay

Example:

$$X[mg/kg] = \frac{10^{\left(\frac{28.5}{-3.251}\right)}}{10^{\left(\frac{29.2}{-3.251}\right)}} * 40 = 65.7 mg/kg$$

Cp_{sample} = 28.5 | Cp_{Quantard} = Ø 29.2 | s = - 3.251 | c = 40 mg/kg

For this example an amount of **65.7 mg walnut / kg food sample** is calculated.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Microsoft Excel template of calculation and detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Validation Report upon request

4.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

4.3 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

