

CONGEN

SureFood® ALLERGEN

Oat

Art. No. S7004
100 rxn

User Manual



June 2025

 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	Vorsichtsmaßnahmen	4
1.7	Geräteeinstellungen	5
1.8	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	Grenzen der Methode	8
4	Weitere Informationen	8
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	8
4.2	Technischer Support	8
4.3	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	Precautions for users	10
1.7	Setup.....	11
1.8	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	Limitations of the method	14
4	Further Information	14
4.1	Product Information	14
4.2	Technical Support	14
4.3	Distribution and Ordering	14

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® ALLERGEN Oat ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und einer spezifischen DNA-Sequenz von Hafer (*Avena sativa*) in Lebensmitteln und Futtermitteln.

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 zwei Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM und VIC/HEX detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q und LTF MyGo Pro.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® Oat 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 der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052) oder der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053), Protokoll 1 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

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -28 bis -16°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 Basic (Art. Nr. S1052) / SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053))
- Real-time PCR Gerät mit zwei Detektionskanälen (510 nm, 580 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

1.7 Geräteeinstellungen

	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

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions- kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Hafer	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx/Mx	Hafer	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Hafer	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf None.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Hafer	FAM	+	Baseline Einstellungen: - Baseline subtracted curve fit - Apply fluorescence drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Hafer	green	+	Ignore cycles before , wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungsanleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	IAC	yellow	+	
Qiagen Rotor- Gene Q	Hafer	green	+	Achtung: Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkeinstellung) eingestellt sein.
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 480 II	Hafer	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Hafer	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 Positive Control.

Der Reaction Mix enthält eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Hafer-Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen* (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

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.
- 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.

* Beschreibung der einzelnen Kontrollen

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – nur PREP Reagenzien
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügte Positive Control

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, siehe Tabelle.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem 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 Positive Control zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem 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 Hafer 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.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Negativkontrolle	negativ	$25 \leq Cp \leq 34$
Positive Control (FAM – Hafer)	$16 \leq Cp \leq 24$	nicht relevant

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- 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.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z.B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validationreport 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



1 General Information

1.1 Description

The SureFood® ALLERGEN Oat is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of specific oat (*Avena sativa*) DNA sequences in food and feed.

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 two fluorescence emissions at the channels FAM and VIC/HEX at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P, Agilent AriaDx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler 480 II, Roche cobas z 480 Analyzer, Qiagen Rotor-Gene Q and LTF MyGo Pro.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN Oat real-time PCR has a limit of detection of $\leq 1 \text{ mg / kg}$ 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 Basic (Art. No. S1052) or 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 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at -28 to -16°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 Basic (Art. No. S1052) / SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053))
- real-time PCR instrument with two detection channels (510 nm, 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 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

1.7 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

1.8 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Oat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx/Mx	Oat	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Oat	FAM	+	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	Oat	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline subtracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	IAC	VIC/HEX	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Oat	green	+	Ignore cycles before , if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cyclor operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter
	IAC	yellow	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Oat	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	+	
Roche LightCycler® 480 II	Oat	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Oat	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 and Positive Control.

The reaction mix contains an internal amplification control (Inhibition control) per reaction.

Reactions needed for the qualitative oat detection:

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.
- 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.

* Description of the controls

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample – only PREP reagents
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

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, see table.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the IAC is not needed to obtain a positive result of the Positive Control.

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 oat 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.

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range	Internal amplification control (IAC)
negative control	negative	$25 \leq Cp \leq 34$
Positive Control (FAM – oat)	$16 \leq Cp \leq 24$	not relevant

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
- 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.
- In highly processed samples, the detection limit may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process– such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/downloads)
- Product-related documents (Download: www.congen.de/en/eifu/)
- 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

