

CONGEN

SureFood[®] ALLERGEN 4plex Soya/Celery/Mustard + IAC

Art. No. S3401
100 rxn

User Manual



November 2021

 **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 Soya/Celery/Mustard+IAC ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung einer spezifischen DNA-Sequenz von Soja (*Glycine max*), Sellerie (*Apium graveolens*) und Senf (*Brassica carinata*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis*) 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.

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 Agilent AriaDx, Bio Molecular Systems MIC, Bio-Rad CFX96/Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER und Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Nachweisgrenze

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

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Verfahrens wurde der SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Matrix: Maismehl) zur Hilfe genommen. 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.

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen* zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert vor 20 erreicht wird.

* z.B. 99,9 % Soja und 0,1 % Sellerie

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 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 oder SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060)
- 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) | 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 Detektionskanaleinstellungen

| Real-time PCR Gerät | Nachweis | Detektions- kanal | Quencher | Bemerkung |
|--|-----------------|------------------------------|-----------------|---|
| Agilent AriaDx/Mx | Sellerie | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| | Senf | ROX | + | |
| | Soja | Cy5 | + | |
| Bio-Rad CFX96/Dx | Sellerie | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| | Senf | ROX | + | |
| | Soja | Cy5 | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | Sellerie | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| | Senf | orange | + | |
| | Soja | red | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | Sellerie | 465-510 | + | Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt. |
| | IAC | 533-580 | + | |
| | Senf | 533-610 | + | |
| | Soja | 618-660 | + | |

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 Sellerie-, Senf- und Soja-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 Sellerie, im ROX-Kanal der Parameter Senf und im Cy5-Kanal der Parameter Soja 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. 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** 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 Sellerie, Senf oder Soja 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.

| Ergebnis im jeweiligen Kanal | | | | Interpretation |
|------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|---|
| FAM-Kanal Sellerie | ROX-Kanal Senf | Cy5-Kanal Soja | VIC/HEX-Kanal IAC | |
| positiv | negativ | negativ | positiv/negativ | Sellerie-DNA nachweisbar |
| negativ | positiv | negativ | positiv/negativ | Senf-DNA nachweisbar |
| negativ | negativ | positiv | positiv/negativ | Soja-DNA nachweisbar |
| negativ | negativ | negativ | positiv | Negativ, Sellerie-, Senf-, und Soja-DNA nicht 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 Soya/Celery/Mustard+IAC is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of specific celery (*Apium graveolens*), mustard (*Brassica carinata*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis*) and soya (*Glycine max*) 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.

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 Agilent AriaDx, Bio Molecular Systems MIC, Bio-Rad CFX96/Dx, R-Biopharm RIDA®CYCLER and Roche LightCycler® 480 II.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN 4plex Soya/Celery/Mustard+IAC PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1.

The limit of detection is determined using the SureFood® QUANTARD Allergen 40 (matrix: corn flour). 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.

Note: Inconsistent mixing ratios* may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (Cp value < 20).

* e.g. 99.9 % soya and 0.1 % celery

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 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 or SureFast® Mag PREP Food Art. Nr. F1060)
- 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) 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 AriaDx/Mx | Celery | FAM | + | |
| | IAC | HEX | + | |
| | Mustard | ROX | + | |
| | Soya | Cy5 | + | |
| Bio-Rad CFX96/Dx | Celery | FAM | + | |
| | IAC | VIC/HEX | + | |
| | Mustard | ROX | + | |
| | Soya | Cy5 | + | |
| R-Biopharm RIDA®CYCLER | Celery | green | + | |
| | IAC | yellow | + | |
| | Mustard | orange | + | |
| | Soya | red | + | |
| Roche LightCycler® 480 II | Celery | 465-510 | + | The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required. |
| | IAC | 533-580 | + | |
| | Mustard | 533-610 | + | |
| | Soya | 618-660 | + | |

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 celery, mustard and soya 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.

Celery DNA is detected in the FAM-channel, mustard DNA is detected in the ROX-channel and soya 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. 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** 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 celery, mustard or soya 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.

| Result in the respective channel | | | | Interpretation |
|----------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|--|
| FAM channel Celery | ROX channel Mustard | Cy5 channel Soya | VIC/HEX channel IAC | |
| positive | negative | negative | positive/negative | Celery DNA detected |
| negative | positive | negative | positive/negative | Mustard DNA detected |
| negative | negative | positive | positive/negative | Soya DNA detected |
| negative | negative | negative | positive | Negative, celery, mustard and soya DNA is not 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

