

# **SureFood<sup>®</sup> ALLERGEN Molluscs**

Art. No. S3613

100 rxn

## **User Manual**



**April 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 Setup.....	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

Mit diesem Test wird Mollusken-DNA gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 qualitativ nachgewiesen. Da die Familie der Mollusken 50.000 bis 60.000 Arten umfasst, ist eine praktische Überprüfung aller Arten nicht möglich. Detaillierte Informationen zu der Spezifität stehen im Validierungsreport SureFood® ALLERGEN Molluscs zur Verfügung.

Der Test ist mit einer internen Amplifikationskontrolle 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 bei 510 nm und 580 nm detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung 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, Agilent AriaDx sowie am Agilent Mx3005P.

### 1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN Molluscs real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 0,4$  mg / kg. Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

### 1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Advanced Kit, 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

- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

# SureFood® ALLERGEN Molluscs (100 Reakt.)

Art. Nr. S3613

April 2019

## 1.6 Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler / R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcycler / LTF MyGo Pro</b>
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	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

<b>Real-time PCR Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektions -Kanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	Mollusken	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Mollusken	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Mollusken	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Mollusken	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	Mollusken	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	Mollusken	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Mollusken	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Mollusken	530	None	SureCC Color Compensation Kit II (Art.-Nr. F4010) wird benötigt. Stellen Sie die Seek Temperature auf 58°C.
	IAC	560	None	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Mollusken	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Mollusken	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 Mollusken-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
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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  $\leq 35$  zeigt.

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  $\leq 2$  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 Mollusken mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

### 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 Weitere Informationen

### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: [www.congen.de/unternehmen/download](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Validierungsdaten
- Produktinformation

### 3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an [sales@r-biopharm.de](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



## 1 General Information

### 1.1 Description

The test detects mollusc DNA according to directive (EC) 1169/2011 qualitatively. The molluscs family contains 50,000 – 60,000 species. Due to the large number of different species a practical verification of all is impossible. More detailed information is available in the Validation Report of SureFood® ALLERGEN Molluscs.

Each reaction contains an internal amplification control. 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). Also 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 capable of detection of at least two fluorescence dyes. Internal validation 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, AriaDx and Agilent Mx3005P.

### 1.2 Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN Molluscs PCR has a limit of detection of  $\leq 0.4$  mg / kg. The limit of detection of the complete assay (DNA extraction and real-time PCR) depends on sample matrix, processing grade, DNA-preparation and DNA-content.

### 1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFood® PREP Advanced, 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 use 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

- real-time PCR instrument
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, capillaries, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes



# SureFood® ALLERGEN Molluscs (100 React.)

Art. No. S3613

April 2019

## 1.6 Setup

	<b>Blockcycler / R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcycler / LTF MyGo Pro</b>
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	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 Setup

<b>Real-time PCR device</b>	<b>Detection</b>	<b>Detection channel</b>	<b>Quencher</b>	<b>Note</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	Molluscs	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	Molluscs	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	Molluscs	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	Molluscs	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	Molluscs	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>LTF MyGo Pro</b>	Molluscs	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
<b>Qiagen Rotor-Gene Q</b>	Molluscs	green	+	
	IAC	yellow	+	
<b>Roche LightCycler® 2.0</b>	Molluscs	530	None	SureCC Color Compensation Kit II (Art.-No. F4010) is required. Check the Seek Temperature is 58°C.
	IAC	560	None	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	Molluscs	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	Molluscs	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 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 molluscs 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
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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 or capillaries.
- 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 or capillaries and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells or capillaries and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates or capillaries 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 need to give the correct results.

A sample is stated **positive**, if the sample DNA shows amplification in the detection system or the obtained Cp value is  $\leq 35$ .

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  $\leq 2$  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 molluscs PCR assay.

### 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 Further Information

### 3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices  
(Download: [www.congen.de/en/company/downloads](http://www.congen.de/en/company/downloads))
- Validation Report
- Product Information

### 3.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to [sales@r-biopharm.de](mailto: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](mailto:orders@r-biopharm.de)  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

