

SureFood® ALLERGEN Walnut

Art. No. S3607

100 rxn

User Manual



January 2018

 Inhalt /  Content

1	Allgemeines	2
1.1	Beschreibung	4
1.2	DNA-Präparation	4
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung	4
1.4	Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien	5
1.5	Geräteeinstellungen	5
1.6	Detektionskanaleinstellungen	5
2	Qualitativer Nachweis	7
2.1	Protokoll	7
2.1.1	Herstellen des Master-Mix	7
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse	8
3	Quantitativer Nachweis	9
3.1	Protokoll	9
3.1.2	Herstellen des Master-Mix	9
3.1.3	Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen	9
3.1.4	Herstellen des real-time PCR-Mix	10
3.2	Interpretation der Ergebnisse	10
4	Weitere Informationen	11
4.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel	11
4.2	Technischer Support	11
4.3	Vertrieb und Bestellung	11
5	General information	12
5.1	Description	12
5.2	DNA-preparation	12
5.3	Kit components and storage	12
5.4	Additionally required equipment and materials	13
5.5	Setup	13
5.6	Detection channel Set-up	13

SureFood® ALLERGEN Walnut (100 React.)

Art. No. S3607

January 2018

6	Qualitative Analysis	14
6.1	Protocol	14
6.1.1	Preparation of the master-mix	14
6.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix.....	15
6.2	Interpretation of results	15
7	Quantitative Analysis	16
7.1	Preparation of the master-mix	16
7.2	Preparation of the standard DNA dilutions	16
7.3	Preparation of the real-time PCR-mix.....	16
7.4	Interpretation of results	17
8	Further information	18
8.1	Product Information	18
8.2	Technical Support	18
8.3	Distribution and ordering	18

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Test wird DNA der Walnussgewächse *Juglans regia* (Walnuss) gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 und *Juglans nigra* (Schwarznuß) qualitativ und/oder quantitativ nachgewiesen. 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.

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 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, 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.

Die SureFood® ALLERGEN Walnut real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von $\leq 0,4$ mg / kg. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 1 mg / kg bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens wurden mit Hilfe des SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Matrix: Maismehl) ermittelt.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) sind abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

1.2 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird das SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1 empfohlen.

1.3 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
4	Dilution Buffer	1 x 2000 µl	Weiß
5	Standard DNA	1 x 80 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.

1.4 Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- Für Quantifizierungen: SureFood® QUANTARD Allergen 40 Art. Nr.: S3301
- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.5 Geräteeinstellungen

	Blockcycler / Bio Molecular Systems MIC	Rotorcycler / LTF MyGo Pro
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

1.6 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions-Kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Walnuss	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	Walnuss	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Walnuss	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	Walnuss	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
BioMolecular Systems MIC	Walnuss	green	+	
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	Walnuss	FAM	+	
	IAC	VIC	+	

**SureFood® ALLERGEN Walnut
(100 React.)**

Art. No. S3607

January 2018

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions-Kanal	Quencher	Bemerkung
Qiagen Rotor-Gene Q	Walnuss	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 2.0	Walnuss	530	None	SureCC Color Compensation Kit II (Art.-Nr. F4010) wird benötigt. Stellen Sie die Seek Temperature auf 58°C.
	IAC	560	None	
Roche LightCycler® 480 II	Walnuss	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Walnuss	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

2 Qualitativer Nachweis

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.

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

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.

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.

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 Quantitativer Nachweis

3.1 Protokoll

3.1.2 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 quantitativen Walnuss-Nachweis:

4 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.

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

3.1.3 Herstellen der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Walnuss-Standardkurve wird die Standard DNA (**Code 5**) in 1:10-Schritten in Dilution Buffer (**Code 4**) verdünnt. Insgesamt werden 4 Verdünnungen benötigt. Es werden 4 Reaktionsgefäße (markiert mit S1 bis S4) 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	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	10.000 Kopien	50.000 Kopien
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S1	1.000 Kopien	5.000 Kopien
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S2	100 Kopien	500 Kopien
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA von S3	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.

Die hergestellten Standard-Verdünnungen sind nach der Verwendung bei -20°C bis zum nächsten Gebrauch aufzubewahren. Die Verdünnungen sind bis zu zwei Monate bei -20°C stabil. Vor dem erneuten Gebrauch sind die Lösungen vollständig aufzutauen, zu durchmischen und vor dem Öffnen zu zentrifugieren.

3.1.4 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.

3.2 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 und kann quantifiziert werden, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem mit Cp-Wert ≤ 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 ≤ 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:

$$X \left[\frac{mg}{kg} \right] = \frac{10 \cdot \left(\frac{C_p \text{ sample}}{s} \right)}{\left(\frac{C_p \text{ QUANTARD}}{s} \right)} * c \text{ QUANTARD}$$

s = Steigung

c = Konzentration

Cp QUANTARD = Ø aus Doppelbestimmung

Beispiel:

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

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 LM** 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
- Produktinformation

4.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung 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



5 General information

5.1 Description

The test detects *Juglans regia* (walnut) DNA according to directive (EC) 1169/2011 and *Juglans nigra* (eastern black walnut) DNA qualitatively and/or quantitatively. 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.

For the quantitative determination the use of the laboratory reference material SureFood® QUANTARD Allergen 40 containing 40 mg walnut / kg food sample and a detection system including a standard dilution is required. 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, LTF MyGo Pro, AriaDx and Agilent Mx3005P.

Note:

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.

The SureFood® ALLERGEN Walnut PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg / kg. The limit of quantification is 1 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1. The limit of detection and limit of quantification were determined using the SureFood® QUANTARD Allergen 40 (matrix: corn flour).

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

5.2 DNA-preparation

For DNA-preparation the use of SureFood® PREP Advanced, protocol 1 is recommended.

5.3 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
4	Dilution Buffer	1 x 2000 µl	White
5	Standard DNA	1 x 80 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 use on the same day.

SureFood® ALLERGEN Walnut (100 React.)

Art. No. S3607

January 2018

5.4 Additionally required equipment and materials

- SureFood® QUANTARD Allergen 40 Art. No.: S3301
- 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

5.5 Setup

	Blockcycler / Bio Molecular Systems MIC	Rotorcycler / LTF MyGo Pro
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

5.6 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Walnut	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Agilent AriaDx	Walnut	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
Applied Biosystems 7500	Walnut	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
Bio-Rad CFX96	Walnut	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
BioMolecular Systems MIC	Walnut	green	+	
	IAC	yellow	+	
LTF MyGo Pro	Walnut	FAM	+	
	IAC	VIC	+	

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Qiagen Rotor-Gene Q	Walnut	green	+	
	IAC	yellow	+	
Roche LightCycler® 2.0	Walnut	530	None	SureCC Color Compensation Kit II (Art.-No. F4010) is required. Check the Seek Temperature is 58°C.
	IAC	560	None	
Roche LightCycler® 480 II	Walnut	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Walnut	465-510	+	
	IAC	540-580	+	

6 Qualitative Analysis

6.1 Protocol

6.1.1 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 walnut 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.

Note: The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8 °C for multiple use on the same day.

6.1.2 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.

6.2 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 ≤ 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 ≤ 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.

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.

7 Quantitative Analysis

7.1 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 walnut detection:

- 4 reactions for the standard curve
- 2 reactions for controls (1x no-template 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.

Note: The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8 °C for multiple use on the same day.

7.2 Preparation of the standard DNA dilutions

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 S1 to S4) and add 45 µl Dilution Buffer each. The following procedure is recommended:

Standard	dilutions	copy number per µl	final copy number per reaction*
S1	45 µl Dilution Buffer + 5 µl Standard DNA	10.000 copies	50.000 copies
S2	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S1	1.000 copies	5.000 copies
S3	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S2	100 copies	500 copies
S4	45 µl Dilution Buffer + 5 µl DNA of S3	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.

If the diluted DNA standards (S1 to S4) are not immediately used, store them at -20°C. The dilution series are stable up to two months at -20°C. Before use allow the reagents to thaw, mix them and centrifuge before use.

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

7.4 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 and can be quantified**, if the sample DNA shows an amplification in the detection system and the obtained Cp value is ≤ 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 ≤ 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.

The calculation of mg allergenic substance/kg food sample can be done for samples showing an amplification curve in the detection system with Cp values < 35 . 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:

$$X \left[\frac{mg}{kg} \right] = \frac{10 \left(\frac{Cp \text{ sample}}{s} \right)}{10 \left(\frac{Cp \text{ QUANTARD}}{s} \right)} * c \text{ QUANTARD}$$

c_p = slope
 c = concentration
 Cp_{QUANTARD} = Ø of double assay

Example:

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

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.

8 Further information

8.1 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
- Product Information

8.2 Technical Support

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

8.3 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

