

CONGEN

**SureFood® ALLERGEN 4plex
Macadamia/Brazil
Nut/Pecan+IAC**

Art. No. S3403

100 rxn

User Manual



June 2018

 Inhalt /  Content

1	Allgemeines	3
1.1	Beschreibung	3
1.2	DNA-Präparation	3
1.3	Kit-Inhalt und Lagerung	3
1.4	Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien	3
1.5	Geräteeinstellungen	4
1.6	Detektionskanaleinstellungen	4
2	Qualitativer Nachweis	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
4	General information	9
4.1	Description	9
4.2	DNA-preparation	9
4.3	Kit components and storage	9
4.4	Additionally required equipment and materials	9
4.5	Setup	10
4.6	Detection channel Set-up	10
5	Qualitative Analysis	11
5.1	Protocol	11
5.1.1	Preparation of the master-mix	11
5.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix	12
5.2	Interpretation of results	12
6	Further information	13
6.1	Product Information	13

SureFood® ALLERGEN 4plex
Macadamia/Brazil Nut/Pecan+IAC (100 React.)

Art. No. S3403

June 2018

6.2	Technical Support	13
6.3	Distribution and ordering	13

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

Mit diesem Multiplex-Test wird DNA von Macadamia, Paranuss und Pekannuss gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 getrennt 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.

Das Nachweisverfahren kann mit den gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig bei 510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm (FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5) detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P, Agilent Aria Dx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II¹, Roche cobas z 480 Analyzer¹ sowie am Qiagen Rotorgene Q.

Die SureFood® ALLERGEN 4plex Macadamia/Brazil Nut/Pecan+IAC real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 0,4 mg / kg bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1. Die Nachweisgrenze des Verfahrens wurde mit Hilfe des SureFood® QUANTARD Allergen 40 (Matrix: Maismehl) ermittelt.

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

Das Nachweisverfahren für Pekannuss weist Querempfindlichkeiten zur Schuppenrinden-Hickorynuss (*Carya Ovata*) auf.

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

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

- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm, 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer

¹ Hinweis: Für Benutzung des Roche LightCycler® 480 II ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes muss der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) verwendet werden.

SureFood® ALLERGEN 4plex Macadamia/Brazil Nut/Pecan+IAC (100 React.)

Art. No. S3403

June 2018

- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.5 Geräteeinstellungen

	Blockcycler / Bio Molecular Systems MIC	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

1.6 Detektionskanaleinstellungen

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions-Kanal	Quencher	Bemerkung
Agilent Mx3005P	Macadamia	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Pekannuss	ROX	+	
	Paranuss	Cy5	+	
Agilent AriaDx	Macadamia	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Pekannuss	ROX	+	
	Paranuss	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	Macadamia	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	Pekannuss	ROX	None	
	Paranuss	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	Macadamia	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
	Pekannuss	ROX	+	
	Paranuss	Cy5	+	

**SureFood® ALLERGEN 4plex
Macadamia/Brazil Nut/Pecan+IAC (100 React.)**

Art. No. S3403

June 2018

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions-Kanal	Quencher	Bemerkung
BioMolecular Systems MIC	Macadamia	green	+	
	IAC	yellow	+	
	Pekannuss	ROX	+	
	Paranuss	Cy5	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Macadamia	green	+	
	IAC	yellow	+	
	Pekannuss	orange	+	
	Paranuss	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Macadamia	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
	Pekannuss	533-610	+	
	Paranuss	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Macadamia	465-510	+	
	IAC	540-580	+	
	Pekannuss	540-610	+	
	Paranuss	610-670	+	

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 Macadamia/Paranuss/Pekannuss-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 Analysen-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** für den jeweiligen Parameter (Macadamia/Paranuss/Pekannuss) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im entsprechenden Kanal (FAM/Cy5/ROX) zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (Macadamia/Paranuss/Pekannuss) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im entsprechenden Kanal (FAM/Cy5/ROX) zeigt. 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 Nachweisgrenzen für die Probe in den spezifischen Nachweissystemen für Macadamia/Paranuss/Pekannuss mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändern.

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				
FAM-Kanal Macadamia	ROX-Kanal Pekannuss	Cy5-Kanal Paranuss	VIC/HEX-Kanal Amplifikations- kontrolle	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv	Macadamia-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv	Pekannuss-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv	Paranuss-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

3 Weitere Informationen

3.1 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

3.2 Technischer Support

Fragen zur Durchführung 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



4 General information

4.1 Description

The multiplex test detects DNA of macadamia, brazil nut and pecan according to directive (EC) 1169/2011. 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, equipped for the detection of four fluorescence emissions at 510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm (FAM, VIC/HEX, ROX and Cy5) at the same time. Internal validation was performed on Applied Biosystems 7500, Agilent Mx3005P, Agilent Aria Dx, Bio-Rad CFX96, Roche LightCycler® 480 II², Roche cobas z 480 Analyzer² and Qiagen Rotorgene Q.

The SureFood® ALLERGEN 4plex Macadamia/Brazil Nut/Pecan+IAC PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg / kg using SureFood® PREP Advanced, protocol 1. The limit of detection was determined using the SureFood® QUANTARD Allergen 40 (matrix: corn flour).

The limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA-preparation and DNA-content.

For the Pecan real-time PCR system cross reactivity was observed with DNA extracts from shagbark hickory (*Carya Ovata*).

4.2 DNA-preparation

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

4.3 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

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.

4.4 Additionally required equipment and materials

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

² Note: For users of the Roche LightCycler® 480 II instrument a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) must be used for the color compensation of such devices.

SureFood® ALLERGEN 4plex Macadamia/Brazil Nut/Pecan+IAC (100 React.)

Art. No. S3403

June 2018

4.5 Setup

	Blockcycler / Bio Molecular Systems MIC	Rotorcyclcr
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

4.6 Detection channel Set-up

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Agilent Mx3005P	Macadamia	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Pecan	ROX	+	
	Brazil Nut	Cy5	+	
Agilent AriaDx	Macadamia	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	Pecan	ROX	+	
	Brazil Nut	Cy5	+	
Applied Biosystems 7500	Macadamia	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	Pecan	ROX	None	
	Brazil Nut	Cy5	None	
Bio-Rad CFX96	Macadamia	FAM	+	
	IAC	VIC	+	
	Pecan	ROX	+	
	Brazil Nut	Cy5	+	
BioMolecular Systems MIC	Macadamia	green	+	
	IAC	yellow	+	
	Pecan	ROX	+	
	Brazil Nut	Cy5	+	

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Qiagen Rotor-Gene Q	Macadamia	green	+	
	IAC	yellow	+	
	Pecan	orange	+	
	Brazil Nut	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	Macadamia	465-510	+	
	IAC	533-580	+	
	Pecan	533-610	+	
	Brazil Nut	618-660	+	
Roche cobas® z 480 Analyzer	Macadamia	465-510	+	
	IAC	540-580	+	
	Pecan	540-610	+	
	Brazil Nut	610-670	+	

5 Qualitative Analysis

5.1 Protocol

5.1.1 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 Macadamia/Brazil Nut/Pecan 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.

5.1.2 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.

5.2 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** for the respective parameter (macadamia/brazil nut/pecan), if the sample DNA shows amplification in the respective channel (FAM/Cy5/ROX).

A sample is stated **negative** for the respective parameter (macadamia/brazil nut/pecan), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel (FAM/Cy5/ROX). 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 Macadamia/Brazil Nut/Pecan 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.

result in the respective channel				
FAM-channel macadamia	ROX-channel pecan	Cy5-channel brazil nut	VIC/HEX-channel amplification control	result
positive	negative	negative	positive	macadamia DNA detected
negative	positive	negative	positive	pecan DNA detected
negative	negative	positive	positive	brazil nut DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid [#]

6 Further information

6.1 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

6.2 Technical Support

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

6.3 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

