

SureFood® ALLERGEN ID Walnut (100 React.)

Art. No. S3107

Version 2.4

	Blockcycler	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 35 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 35 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: BHQ Passive reference: none	LightCycler® Channel: 530 or F1 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: FAM (Green)

3. Preparation of the PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tubes/wells or capillaries of the negative control (it 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 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 PCR instrument and start the run according to the setup.

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 amplifications in the walnut system. The PCR system is a very sensitive test specific for walnut. During internal analysis with the laboratory reference material SureFood® QUANTARD Allergen it was shown that 4 ppm walnut samples extracted with the SureFood® PREP Advanced, protocol 1 were detected in cycle 30. This value is helpful for the interpretation of results obtained with the analytical sample.

A sample is stated **negative**, if the sample DNA shows no amplification in the detection system. In case of a **negative** result the inhibition control of the sample must be **positive**. Is this not the case the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the samples is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

Product Information

- Validation Report
- Product Information
- Material Safety Data Sheet

Technical Support

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

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



SureFood® ALLERGEN ID Walnut (100 Reakt.)

Art. Nr. S3107

Version 2.4

Beschreibung

Mit diesem Test wird Walnuss-DNA nachgewiesen. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Stratagene MxSeries etc.) verwendet werden.

Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN ID Walnut real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von $\leq 0,4$ ppm.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

DNA-Präparation

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

Kit-Inhalt und Lagerung

2x	Walnut Reaction Mix (1,1 ml)	(Code 1)
2x	Inhibition Control Mix (1,1 ml)	(Code 2)
1x	Taq Polymerase (22 µl)	(Code 3)
1x	Positive Control (200 µl)	(Code 4)

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei -20°C zu lagern.

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- Real-time PCR Gerät
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Kapillaren)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern

Protokoll

1. Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und eine Inhibitionskontrolle je Probe. Die Überprüfung auf Inhibitoren (Inhibition Control) erfolgt durch Zugabe der Proben-DNA in ein mit Inhibition Control Master-Mix befülltes Reaktionsgefäß. Zur Kontrolle des Inhibition Control Master-Mixes wird außerdem eine Reaktion ohne Probenzugabe durchgeführt (Positivkontrolle des Inhibition Control Mixes).

Desweiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Walnut Reaction Mix oder Inhibition Control Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	220 µl

Master-Mix im Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2. Geräteeinstellungen

Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung:

<http://www.congen.de/unternehmen/download>

SureFood® ALLERGEN ID Walnut (100 Reakt.)

Art. Nr. S3107

Version 2.4

	Blockcycler	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 35 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 35 10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: BHQ Passive reference: none	LightCycler® Channel: 530 oder F1 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: FAM (Green)

3. Herstellen des PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß (Gefäße/Platten, Kapillaren).
- 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 PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **positiv** bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Walnuss-System zeigt. Das vorliegende PCR System ist ein sehr empfindliches Nachweisverfahren für Walnuss. Innerhalb von Testungen mit dem Vergleichsmaterial SureFood® QUANTARD Allergen hat sich gezeigt, dass 4 ppm Walnuss, bei Extraktion mit dem SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1, etwa im Zyklus 30 detektiert werden. Dieser Wert unterstützt die Interpretation der Untersuchungsergebnisse.

Eine Probe wird als **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Bei einem **negativen** Ergebnis einer Probe muss die zugehörige Inhibitionskontrolle **positiv** sein. Andernfalls sind in der Probe PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

Weitere Informationen

- Validierungsdaten
- Produktinformation
- Material Safety Data Sheet

Technischer Support

Fragen zur Durchführung bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

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



CONGEN Biotechnologie GmbH | Robert-Roessle-Straße 10 | 13125 Berlin
Tel: +49 30 9489-3500 | Fax +49 30 9489-3510 | e-mail: info@congen.de | www.congen.de

SureFood® ALLERGEN ID Walnut (100 React.)

Art. No. S3107

Version 2.4

Description

The test detects walnut DNA. The real-time PCR assay can be used with established real-time PCR instruments (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Stratagene MxSeries etc.).

Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN ID Walnut real-time PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 ppm. The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

DNA-preparation

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

Kit components and storage

2x	Walnut Reaction Mix (1.1 ml)	(Code 1)
2x	Inhibition Control Mix (1.1 ml)	(Code 2)
1x	Taq Polymerase (22 µl)	(Code 3)
1x	Positive Control (200 µl)	(Code 4)

Store all reagents at -20°C and protected from light.

Additionally required equipment and materials

- Real-time PCR instrument
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, capillaries)
- Pipettes with filter tips

Protocol

1. Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, positive control, extraction control and inhibition control for each sample. For the inhibition control add the sample DNA to a reaction tube with the inhibition control master-mix. To control the function of the inhibition control mix one reaction is prepared without adding sample DNA to the inhibition control master-mix (positive control of the inhibition control mix).

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 by vortexing and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Walnut Reaction Mix or Inhibition Control Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
Total volume	20 µl	220 µl

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2. Setup

Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage:

<http://www.congen.de/en/company/download>

CONGEN Biotechnologie GmbH | Robert-Roessle-Straße 10 | 13125 Berlin
Tel: +49 30 9489-3500 | Fax +49 30 9489-3510 | e-mail: info@congen.de | www.congen.de