

**SureFood® ALLERGEN ID Lupin
(100 Reakt.)**

Art. Nr. S3111

Version 2.3

Beschreibung

Mit diesem Test wird Lupinen-DNA gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 nachgewiesen. Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten (Roche LightCycler®, Rotor-Gene Q, ABI PRISM, Eppendorf realplex, BioRad CFX96, Agilent MxSeries etc.) verwendet werden.

Zusätzlich enthält das Kit einen Inhibition Control Mix, mit dem DNA auf inhibitorische Substanzen, die die PCR unterdrücken, überprüft wird. In der Inhibition Control liegen alle Reagenzien vor, die für die PCR benötigt werden, inklusive einem künstlichen Target (Konzentration: 800 Kopien pro Reaktion) und der passenden real-time PCR Sonde. Dieses Target wird amplifiziert und kann in allen gängigen real-time PCR Geräten (s. o.) detektiert werden. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in einer zugefügten DNA wird die Amplifikation unterdrückt und das Signal gestört.

Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Desweiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN ID Lupin real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von $\leq 0,4$ mg/kg allergenem Bestandteil in nicht prozessiertem Maismehl bei Verwendung des SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens (DNA-Extraktion und real-time PCR) 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	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, Kapillaren, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

Protokoll

1. Herstellen des Master-Mix

Sowohl für das Nachweissystem als auch für die Inhibition Control ist die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden im Nachweissystem empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Positivkontrolle. Die Überprüfung auf Inhibitoren (Inhibition Control) sollte für jede Probe durchgeführt werden und erfolgt durch Zugabe der Proben-DNA in ein mit Inhibition Control Master-Mix befülltes Reaktionsgefäß. Zur Kontrolle des Inhibition Control Master-Mixes werden außerdem zwei Reaktionen ohne Probenzugabe durchgeführt (Positivkontrolle der Inhibition Control).

Desweiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, vortexen und zentrifugieren. Die Taq Polymerase sollte nicht aufgetaut und nicht im Vortex gemischt werden.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
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

	Blockcycler	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
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)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

3. 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.

SureFood® ALLERGEN ID Lupin (100 React.)

Art. No. S3111

Version 2.3

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 lupin system. The PCR system is a very sensitive test for lupin. During internal analysis with the laboratory reference material SureFood® QUANTARD Allergen it was shown that 4 mg/kg lupin samples extracted with the SureFood® PREP Advanced, protocol 1 were detected in cycle 29. 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 and the inhibition control shows no inhibitory effects.

For evaluation of the inhibition control, the signal of the sample DNA is compared to the signal of the positive control (reaction without sample DNA). If the sample DNA shows a positive signal with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the positive control, the reaction is not influenced by PCR inhibiting substances. The DNA can be used directly for the specific detection system.

If the sample DNA shows no amplification in the inhibition control or a shift in Cp-value > 2 compared to the positive control (reaction without sample DNA), 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 1:5 to 1:10 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific PCR assay.

The inhibition control is a heterologous PCR system. It can be influenced by other factors than the specific detection system.

Product Information

- Validation Report
- Product Information

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 Lupin (100 Reakt.)

Art. Nr. S3111

Version 2.3

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 Lupinen-System zeigt. Das vorliegende PCR System ist ein sehr empfindliches Nachweisverfahren für Lupinen. Innerhalb von Testungen mit dem Vergleichsmaterial SureFood® QUANTARD Allergen hat sich gezeigt, dass 4 mg/kg Lupine, bei Extraktion mit dem SureFood® PREP Advanced Kit, Protokoll 1, etwa im Zyklus 29 detektiert werden. Dieser Wert unterstützt die Interpretation der Untersuchungsergebnisse.

Eine Probe wird als negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die Inhibition Control keine Inhibition anzeigt.

Zur Auswertung der Inhibition Control wird das Signal der Proben-DNA mit dem Signal der Positivkontrolle (Reaktion ohne Probenzugabe) verglichen. Bei einem positiven Signal der Proben-DNA mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Positivkontrolle wird die Reaktion nicht durch PCR-inhibitorische Substanzen gestört. Die Proben-DNA kann unverdünnt in das spezifische Nachweissystem eingesetzt werden.

Sollte die Proben-DNA in der Inhibition Control keine Amplifikation oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Positivkontrolle (Reaktion ohne Probenzugabe) 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 1:5 bis 1:10 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Die Nachweisgrenze für die Probe verändert sich im spezifischen Nachweissystem mit dem gewählten Verdünnungsfaktor.

Bei der Inhibition Control handelt es sich um ein heterologes PCR-System, das sich abweichend vom Nachweissystem verhalten kann.

Weitere Informationen

- Validierungsdaten
- Produktinformation

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



SureFood® ALLERGEN ID Lupin (100 React.)

Art. No. S3111

Version 2.3

Description

The test detects lupin DNA according to directive (EC) 1169/2011. 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, Agilent MxSeries etc.).

The kit also contains an Inhibition Control to examine DNA for inhibiting substances which interfere with the PCR mix. The Inhibition Control contains all reagents necessary for PCR as well as an artificial target (concentration: 800 copies / reaction) and the corresponding real-time PCR probe. The target is amplified during the PCR run and can be detected with established real-time PCR instruments (please see above). When the DNA contains PCR inhibiting substances, amplification of the target will be suppressed and the signal will be affected.

Some 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.

Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN ID Lupin PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg/kg allergenic substance in non-processed corn flour using using SureFood® PREP Advanced, protocol 1.

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.

DNA-preparation

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

Kit components and storage

2x	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, caps)
- pipettes with filter tips
- unpowdered disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

SureFood® ALLERGEN ID Lupin (100 React.)

Art. No. S3111

Version 2.3

Protocol

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 test for inhibiting substances (inhibition control) should be performed for each sample by adding the sample DNA to a reaction tube containing the inhibition control master-mix. To control the function of the inhibition control master-mix, two reactions are prepared without adding sample DNA (positive control of the inhibition control).

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. The tube of the Taq Polymerase should be kept at -20°C and not be mixed by vortexing.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components for master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
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

	Blockcycler	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
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)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/download		

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 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.