

**SureFood® ALLERGEN QUANT Celery
(100 Reakt.)****Art. Nr. S3205**

Version 4.0

Beschreibung

Mit diesem Test wird Sellerie-DNA gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 nachgewiesen. Für die quantitative Bestimmung werden das Vergleichsmaterial SureFood® QUANTARD Allergen 40 mit einem Gehalt von 40 mg Selleriesaat / kg Lebensmittel (LM) und ein Nachweis-System für Sellerie inklusive Standardreihe verwendet. 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: 200 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.

Hinweis

Generell können alle homogenen Lebensmittelproben für die Analyse eingesetzt werden. Für die 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 LM, unter Verwendung des SureFood® QUANTARD Allergen 40 mit einer Konzentration von 40 mg/kg, validiert.

Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN QUANT Celery 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.

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	Dilution Buffer (2,0 ml)	(Code 4)
1x	Standard DNA (80 µl)	(Code 5)

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

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 Reakt.)

Art. Nr. S3205

Version 4.0

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- **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

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, Standardkurve als 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).

Benötigte Reaktionen für den Sellerie-Nachweis:

Je Lauf: 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

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.

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 React.)

Art. No. S3205

Version 4.0

Product Information

- **Microsoft Excel template of calculation**
(Download: www.congen.de/en/company/download)
- 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 QUANT Celery (100 Reakt.)

Art. Nr. S3205

Version 4.0

2. Geräteeinstellungen

	Blockcycler	Rotorcycler
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
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 der Standard DNA-Verdünnungen

Für die Erstellung der Sellerie-Standardkurven 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 Monaten bei -20°C stabil. Vor dem erneuten Gebrauch sind die Lösungen vollständig aufzutauen, auf dem Vortex zu durchmischen und vor dem Öffnen zu zentrifugieren.

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.

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 Reakt.)

Art. Nr. S3205

Version 4.0

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 negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt oder der ermittelte Cp-Wert > 35 beträgt. Die Inhibition Control darf keine Inhibition anzeigen.

Eine Probe wird als positiv bewertet und kann quantifiziert werden, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im Nachweissystem mit Cp-Wert ≤ 35 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.

Für die Quantifizierung von Proben mit einer Amplifikation im Nachweissystem und Cp ≤ 35 werden die Reaktionen für die Standards, die Kontrollen und die Proben markiert und entsprechend der Auswertungsvorschrift des Geräteherstellers analysiert. Die Steigung (slope) der Standardkurve muss einen Wert zwischen -3,1 und -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient R² > 0,98 sein. Bei abweichenden Werten kann die Standardkurve nicht für die Auswertung verwendet werden.

Für die Umrechnung der Ergebnisse in mg allergener Bestandteil/ kg Lebensmittel wird folgende Formel eingeführt:

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

s = Steigung
c = Konzentration
Cp QUANTARD = Ø aus Doppelbestimmung

Beispiel:

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

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 Sellerie / kg LM** für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 React.)

Art. No. S3205

Version 4.0

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 negative, if the sample DNA shows no amplification in the detection system or the calculated Cp value is > 35. The inhibition control must show no inhibitory effects.

A sample is stated positive and can be quantified, if the sample DNA shows amplification in the detection system with Cp value ≤ 35. The inhibition control must show 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.

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 R² > 0.98. In case of different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

For a final calculation of mg allergenic substance / kg food sample following formula is introduced:

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

s = slope
c = concentration
Cp QUANTARD = Ø of double assay

Example:

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

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 celery / kg food sample** is calculated.

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 React.)

Art. No. S3205

Version 4.0

2. Setup

	Blockcycler	Rotorcycler
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
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 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 on a vortex and centrifuge before use.

4. 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.

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 Reakt.)

Art. Nr. S3205

Version 4.0

Weitere Informationen

- Microsoft Excel Berechnungsvorlage**
(Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- 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 QUANT Celery (100 React.)

Art. No. S3205

Version 4.0

Description

The test detects celery DNA according to directive (EC) 1169/2011. For the quantitative determination the use of the laboratory reference material SureFood® QUANTARD Allergen 40 containing 40 mg celery seeds / kg food sample and a standard dilution is required. 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: 200 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.

Remarks

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.

Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN QUANT Celery 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.

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	Dilution Buffer (2.0 ml)	(Code 4)
1x	Standard DNA (80 µl)	(Code 5)

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

SureFood® ALLERGEN QUANT Celery (100 React.)

Art. No. S3205

Version 4.0

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

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, standard curve as 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).

Reactions needed for the celery detection:

For each run: 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

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.