

SureFood® ALLERGEN QUANT Walnut (100 React.)

Art.-Nr. S3207

Version 1.0

Example:

$$X \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \frac{10 \cdot \frac{28.5 - 40.54}{-3.251}}{\frac{29.2 - 40.54}{-3.251}} * 40 = 65.7 \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

$C_{t \text{ sample}} : 28.5$
 $C_{t \text{ QUANTARD}} : \emptyset 29.2$
 $a: 40.54$
 $s: -3.251$
 $c: 40$

For this example an amount of **65.7 mg walnut / kg food sample** is calculated.

Product Information

- **Microsoft Excel template of calculation**
(Download: www.congen.de/surefood-produkte-pcr/allergene.html)
- 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



 Seiten 1 bis 4
 Pages 5 to 8

SureFood® ALLERGEN QUANT Walnut (100 Reakt.)

Art.-Nr. S3207

Version 1.0

Beschreibung

Dieser Test dient der quantitativen Bestimmung von Walnuss in Lebensmitteln gemäß Verordnung (EU) 1169/2011. Für die quantitative Bestimmung werden das Vergleichsmaterial SureFood® QUANTARD Allergen 40 mit einem Gehalt von 40 mg Walnuss / kg Lebensmittel (LM) und ein Nachweis-System für Walnuss 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.

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 und 400 mg allergener Bestandteil / kg LM, unter Verwendung des SureFood® QUANTARD Allergen 40 mit einer Konzentration von 40 mg/kg, validiert.

Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN QUANT Walnut real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von $\leq 0,4$ mg/kg. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 1 mg/kg bei Verwendung von SureFood® PREP Allergen. 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 Allergen Kit 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.

Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- **SureFood® QUANTARD Allergen 40 Art.-Nr.: S3301**
- 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, Kontrollen und Standards) 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 gefülltes Reaktionsgefäß. Zur Kontrolle des Inhibition Control Master-Mixes wird außerdem eine Reaktion ohne Probenzugabe durchgeführt (Positivkontrolle des Inhibition Control Mixes).

Benötigte Reaktionen für den Walnuss-Nachweis:

Je Lauf: 4 Reaktionen für die Standardkurve
4 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle und 2x SureFood® QUANTARD Allergen 40 DNA)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Es wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen eventuellen 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%)
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. Herstellen der Standard DNA Verdünnungen

Für die Erstellung der Walnuss-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. Setup

	Blockcycler	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	5 min, 95°C 45 15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	1 min, 95°C 45 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)

Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage <http://www.congen.de/en/information/device-settings-for-surefood-real-time-pcr-kits.html>

Interpretation of results

The negative and positive controls 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 result is below the limit of detection. In case of a **negative** result the inhibition control of the sample must be **positive**. If this is not the case, the sample contains PCR-inhibiting substances. Under these circumstances an evaluation of the sample is not possible. DNA isolation and purification for the sample need to be improved.

The calculation of mg allergenic substance/kg food sample can be done for samples showing an amplification curve in the detection system. Therefore mark the standards, the controls and the samples and make the evaluation according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer. The value for the slope of the standard curve has to be between -3.2 and -3.6 and the correlation coefficient > 0.98. If you obtain different values for the standard curve, it should not be used for calculation.

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

a = axis intercept
s = slope
c = concentration
C_t QUANTARD = Ø of double assay

$$X \left[\frac{mg}{kg} \right] = \frac{10}{\left(\frac{Ct_{sample} - a}{s} \right)} * c_{QUANTARD}$$

Reactions needed for the walnut detection:

For each run: 4 reactions for the standard curve
4 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control and 2x 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.

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. 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 carefully before use.

3. Preparation of the PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells or capillaries.
- Close the tube of the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes. Close the tubes.
- Pipette 5 µl of the SureFood® QUANTARD 40 Allergen DNA and the standard dilutions into the designated tubes. Close the tubes.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the PCR instrument and start the run according to the setup.

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 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 PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

4. Geräteeinstellungen

	Blockcycler	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation Annealing/Extension (CYCLE)	15 sec, 95°C 30 sec, 60°C	10 sec, 95°C 15 sec, 60°C
Temperature Transition Ramp Rate	Maximum	Maximum
Fluorescence Detection Setup	Detection: End of extension phase Reporter Dye: FAM Quencher Dye: BHQ Passive reference: none	LightCycler® Channel: 530 bzw. F1 Acquisition mode: Single in extension phase Rotor-Gene Q Reporter Dye: Green

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

<http://www.congen.de/information/geraeteinstellungen-fuer-surefood-kits.html>

Interpretation der Ergebnisse

Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Eine Probe wird **negativ** bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im Nachweisverfahren zeigt oder das ermittelte Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze des Verfahrens liegt. 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.

Für die Quantifizierung von Proben mit einer Amplifikation im Nachweissystem 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 -3,2 bis -3,6 aufweisen und der Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,98$ 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:

a = Achsenabschnitt
s = Steigung
c = Konzentration
C_t QUANTARD = Ø aus Doppelbestimmung

$$X \left[\frac{mg}{kg} \right] = \frac{10 \cdot \left(\frac{Ct_{sample} - a}{s} \right)}{\left(\frac{Ct_{QUANTARD} - a}{s} \right)} * c_{QUANTARD}$$

Beispiel:

C_t sample : 28,5
C_t QUANTARD : Ø 29,2
a: 40,54
s: - 3,251
c: 40

$$X \left[\frac{mg}{kg} \right] = \frac{10 \cdot \left(\frac{28,5 - 40,54}{-3,251} \right)}{\left(\frac{29,2 - 40,54}{-3,251} \right)} * 40 = 65,7 \frac{mg}{kg}$$

Somit errechnet sich ein Walnuss-Anteil von **65,7 mg Walnuss/ kg LM** für die hier beschriebene Beispiel-Probe.

Weitere Informationen

- **Microsoft Excel Berechnungsvorlage**
(Download: www.congen.de/surefood-produkte-pcr/allergene.html)
- 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



Description

The test detects the quantitative DNA amount of walnut in food samples according to directive (EC) 1169/2011. For the quantitative determination the use of the laboratory reference material SureFood® QUANTARD Allergen 40 containing 40 mg walnut/kg food sample and a standard dilution is recommended. 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.).

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 to 400 mg allergenic ingredient / kg food sample using the reference material SureFood® QUANTARD Allergen 40 containing 40 mg allergenic ingredient / kg food sample.

Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN QUANT Walnut PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg/kg. The limit of quantification is 1 mg/kg using SureFood® PREP Allergen. The limit of detection and 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 Allergen 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.

Additionally required equipment and materials

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