

**SureFood® ALLERGEN 4plex Soya/Celery/Mustard+IAC
(100 Reakt.)**

Art. Nr. S3401

Version 1.4

Beschreibung

Mit diesem Multiplex-Test wird DNA von Soja, Sellerie und Senf gemäß Verordnung (EU) 1169/2011 getrennt nachgewiesen. 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 Agilent Mx3005P, Roche LightCycler® 480 II*, Applied Biosystems 7500, BioRad CFX96 und Qiagen Rotor-Gene Q.

Zusätzlich enthält das Kit eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle, IAC), mit der DNA auf inhibitorische Substanzen, die die PCR unterdrücken, überprüft wird. Im Reaction Mix liegen alle Reagenzien vor, die für die PCR benötigt werden, inklusive einem künstlichen Target (Konzentration: 500 Kopien pro Reaktion). Dieses Target wird amplifiziert und im VIC/HEX-Kanal detektiert. 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 4plex Soya/Celery/Mustard+IAC 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.

Durch eine sehr hohe Konzentration von Soja oder Senf ist es möglich, dass die Sensitivität des Sellierysystems beeinträchtigt wird.

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)
1x	Taq Polymerase (11 µl)	(Code 2)
1x	Positive Control (200 µl)	(Code 3)

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

Zusätzliche 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
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

* Hinweis: Für Benutzer 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 Soja/Celery/Mustard+IAC (100 Reakt.)

Art. Nr. S3401

Version 1.4

Protokoll

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, Positivkontrolle. Der Reaction Mix enthält neben dem Soja-, Sellerie- und Senf-Nachweis zusätzlich eine interne Amplifikationskontrolle (Inhibitionskontrolle) pro Reaktion.

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	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

	Blockcyler*	Rotorcyler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 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 Messung Sellerie: im FAM-Kanal (LC480 II Kanal 465-510) Messung Interne Amplifikationskontrolle: im VIC/HEX-Kanal (LC480 II Kanal 533-580) Messung Senf: im ROX-Kanal (LC480 II Kanal 533-610) Messung Soja: im Cy5-Kanal (LC480 II Kanal 618-660)	Detection: End of extension phase Messung Sellerie: im FAM-Kanal (Green) Messung interne Amplifikationskontrolle: im VIC/HEX-Kanal (Yellow) Messung Senf: im ROX-Kanal (Orange) Messung Soja: im Cy5-Kanal (Red)
Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte stehen auf der CONGEN-Homepage zur Verfügung: http://www.congen.de/unternehmen/download		

* Hinweis: Für Benutzer 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.

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.

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.

Soja-DNA wird im Cy5-Kanal, Sellerie-DNA im FAM-Kanal, Senf-DNA im ROX-Kanal und die interne Amplifikationskontrolle im VIC/HEX-Kanal nachgewiesen.

Eine Probe wird als **positiv** für den jeweiligen Parameter (Soja/Sellerie/Senf) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im entsprechenden Kanal (Cy5/FAM/ROX) zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (Soja/Sellerie/Senf) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im entsprechenden Kanal (Cy5/FAM/ROX) zeigt und die zugehörige interne Amplifikationskontrolle (VIC/HEX) **positiv** ist (siehe dazu auch Tabelle Seite 3).

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

Ergebnis im jeweiligen Kanal				
FAM-Kanal Sellerie	ROX-Kanal Senf	Cy5-Kanal Soja	VIC/HEX-Kanal Amplifikations- kontrolle	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv / negativ	Sellerie-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv / negativ	Senf-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv / negativ	Soja-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar [#]

[#] Sollte eine Probe in allen Kanälen inklusive dem VIC/HEX-Kanal negativ sein, sind in der Proben-DNA PCR-Inhibitoren vorhanden. In diesem Fall kann keine Aussage getroffen werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe muss verbessert werden.

SureFood® ALLERGEN 4plex Soya/Celery/Mustard+IAC (100 Reakt.)

Art. Nr. S3401

Version 1.4

Weitere Informationen

- Validierungsdaten

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 multiplex test detects DNA of soya, celery and mustard according to directive (EC) 1169/2011. 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. The technical validation was performed on Agilent Mx3005P, Roche LightCycler® 480 II*, Applied Biosystems 7500, BioRad CFX96 und Qiagen Rotor-Gene Q.

The kit also contains an internal amplification control (inhibition control, IAC) to examine DNA for inhibiting substances which interfere with the PCR mix. The Reaction Mix contains all reagents necessary for PCR as well as an artificial target (concentration: 500 copies / reaction). The target is amplified during the PCR run and detected in the VIC/HEX-channel. 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 4plex Soya/Celery/Mustard+IAC PCR has a limit of detection of ≤ 0.4 mg/kg allergenic substance in non-processed corn flour 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.

Very high levels of soya or mustard might influence the sensitivity of the celery detection system.

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)
1x	Taq Polymerase (11 µl)	(Code 2)
1x	Positive Control (200 µl)	(Code 3)

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

Additionally required equipment and materials

- real-time PCR instrument, equipped with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm, 660 nm)
- 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

* 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.

Protocol

1. Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions). Recommended control reactions: negative control, extraction control, positive control. Beside the soya/celery/mustard detection assays the Reaction Mix includes an internal amplification control (inhibition control) for each reaction.

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	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

	Blockcyler*	Rotorcyler
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	5 min, 95°C 35	1 min, 95°C 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 Detection of celery: in the FAM-channel (LC480 II channel 465-510) Detection of the internal amplification control: in the VIC/HEX-channel (LC480 II channel 533-580) Detection of mustard: in the ROX-channel (LC480 II channel 533-610) Detection of soya: in the Cy5-channel (LC480 II channel 618-660)	Detection: End of extension phase Detection of celery: in the FAM-channel (Green) Detection of the internal amplification control: in the VIC/HEX-channel (Yellow) Detection of mustard: in the ROX-channel (Orange) Detection of soya: in the Cy5-channel (Red)
Detailed information on the setup of several real-time PCR devices is available at the CONGEN homepage: http://www.congen.de/en/company/downloads		

* 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.

3. 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.

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.

Soya DNA is detected in the Cy5-channel, mustard DNA is detected in the ROX-channel, celery DNA is detected in the FAM-channel and the internal amplification control is detected in the VIC/HEX-channel.

A sample is stated **positive** for the respective parameter (soya/celery/mustard), if the sample DNA shows amplification in the respective channel (Cy5/FAM/ROX).

A sample is stated **negative** for the respective parameter (soya/celery/mustard), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel (Cy5/FAM/ROX) and the internal amplification control (VIC/HEX) of the sample is **positive** (see also table on page 7).

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

result in the respective channel				
FAM-channel celery	ROX-channel mustard	Cy5-channel soya	VIC/HEX-channel amplification control	result
positive	negative	negative	positive/ negative	celery DNA detected
negative	positive	negative	positive/ negative	mustard DNA detected
negative	negative	positive	positive/ negative	soya DNA detected
negative	negative	negative	negative	invalid [#]

[#]In case of a negative result in all channels including the VIC/HEX-channel, 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.

Product Information

- Validation Report

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

