

Beschreibung

Mit diesem Multiplex-Test werden Erdnuss-, Haselnuss- und Walnuss-DNA 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 (Agilent MxSeries, Roche LightCycler® 480 II*, ABI PRISM, BioRad CFX96 etc.), verwendet werden.

Nachweisgrenze

Die SureFood® ALLERGEN 4plex Peanut/Hazelnut/Walnut+IAC real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 1 mg/kg.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist 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)
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
- real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- 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 und Extraktionskontrolle. Der Master-Mix enthält neben dem Erdnuss-, Haselnuss- und Walnuss-Nachweis auch 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.

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.

* Hinweis: Für Benutzer des Roche LightCycler® 480 II ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes wird der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. S4009) empfohlen.

2. Geräteeinstellungen

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

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

	Blockcyler/LightCycler® 480 II*	Rotor-Gene Q
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 Erdnuss: im FAM-Kanal (LC480 II Kanal 465-510) Messung Interne Amplifikationskontrolle: im VIC/HEX-Kanal (LC480 II Kanal 533-580) Messung Walnuss: im ROX-Kanal (LC480 II Kanal 533-610) Messung Haselnuss: im Cy5-Kanal (LC480 II Kanal 618-660)	Detection: End of extension phase Messung Erdnuss: im FAM-Kanal (Green) Messung interne Amplifikationskontrolle: im VIC/HEX-Kanal (Yellow) Messung Walnuss: im ROX-Kanal (Orange) Messung Haselnuss: im Cy5-Kanal (Red)

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

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

3. Herstellen des 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 PCR Gerät einsetzen und die PCR entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

*Hinweis: Für Benutzer des Roche LightCycler® 480 II ist eine Color Compensation (Farbstoffkalibrierung) notwendig. Für die Color Compensation dieses Gerätes wird der SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. S4009) empfohlen.

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** for the respective parameter (peanut/hazelnut/walnut), if the sample DNA shows amplification in the respective channel. A sample is stated **negative** for the respective parameter (peanut/hazelnut/walnut), if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and the internal signal (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** (see also table on page 6).

result in the respective channel				result
FAM-channel peanut	ROX-channel walnut	Cy5-cannel hazelnut	VIC/HEX-channel amplification control	
positive	negative	negative	positive/ negative	peanut DNA detected
negative	positive	negative	positive/ negative	walnut DNA detected
negative	negative	positive	positive/ negative	hazelnut 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
- Product Information
- Material Safety Data Sheet

Technical Support

For further questions please 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



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** für den jeweiligen Parameter (Erdnuss/Haselnuss/Walnuss) bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter (Erdnuss/Haselnuss/Walnuss) bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und das zugehörige interne Signal (VIC/HEX-Kanal) **positiv** ist (siehe dazu auch Tabelle Seite 3).

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis
FAM-Kanal Erdnuss	ROX-Kanal Walnuss	Cy5-Kanal Haselnuss	VIC/HEX-Kanal Amplifikationskontrolle	
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	Erdnuss-DNA nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	Walnuss-DNA nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	Haselnuss-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar [#]

[#] Sollte eine Probe in allen Kanälen inklusive dem VIC/HEX-Kanal **negativ** sein, 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 und Auswertung bitte per E-Mail an 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



Description

This multiplex test detects specific DNA sequences of peanut, hazelnut and walnut. 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 (Agilent MxSeries, Roche LightCycler® 480 II†, ABI PRISM, BioRad CFX96 etc.).

Limit of Detection

The SureFood® ALLERGEN 4plex Peanut/Hazelnut/Walnut+IAC real-time PCR has a limit of detection of ≤ 1 mg/kg. 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 Allergen 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
- real-time PCR consumables (plates, tubes, foils, caps)
- 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 and extraction control for each sample. Beside peanut/hazelnut/walnut detection assays the master-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.

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 the master-mix well and centrifuge shortly before use.

† Note: For users of the Roche LightCycler® 480 II instrument a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art.-No. S4009) is recommended for the color compensation of such devices.

2. Setup

	Blockcycler / LightCycler® 480 II†	Rotor-Gene Q
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 peanut: 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 walnut: in the ROX-channel (LC480 II channel 533-610) Detection of hazelnut: in the Cy5-channel (LC480 II channel 618-660)	Detection: End of extension phase Detection of peanut: in the FAM-channel (Green) Detection of the internal amplification control: in the VIC/HEX-channel (Yellow) Detection of walnut: in the ROX-channel (Orange) Detection of hazelnut: 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/information/device-settings-for-surefood-real-time-pcr-kits.html>

3. Preparation of the PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes or wells.
- Close the tubes/wells of the negative control (it is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes and close them.
- Pipette 5 µl of the Positive Control into the designated tubes and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the PCR instrument and start the run according to the setup.

† Note: For users of the Roche LightCycler® 480 II instrument a Color Compensation is necessary. The SureCC Color Compensation Kit I (Art.-No. S4009) is recommended for the color compensation of such devices.