

r-biopharm®



RIDASCREEN® FAST Casein

Art. No. R4612

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Casein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of casein

In vitro Test
Lagerung bei 2 - 8 °C

In vitro test
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail: info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Casein in Lebensmitteln wie Backwaren, Backmischungen, nicht-hydrolysiertes milchbasierter Babynahrung, Eis, Getränken, Schokolade, Wein und Wurst.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays – inklusive Standardlösungen – sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben)..... ca. 20 min Probenvorbereitung (für 10 erhitzte Proben) ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit).....30 min
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist Casein von SIGMA Aldrich (Kat. Nr.: C5890).
Nachweisgrenze:	Allergen Extraktionspuffer 0,12 mg/kg (ppm) Casein* 0,07-0,19 mg/kg (ppm) Casein* RIDA® Extractor 2 0,71 mg/kg (ppm) Casein* 0,41- 0,95 mg/kg (ppm) Casein* <i>* abhängig von der untersuchten Matrix</i>
Bestimmungsgrenze:	Allergen Extraktionspuffer 0,5 mg/kg (ppm) Casein RIDA® Extractor 2 2,5 mg/kg (ppm) Casein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit Casein aus Kuhmilch. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch. Es sind keine weiteren Kreuzreaktivitäten bekannt. Insbesondere besteht keine Kreuzreaktivität zu β -Lactoglobulin.

Die Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z. B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten/verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Spikeversuche erkannt werden.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Milchprotein

RIDA[®] Extractor 2 (R4613)

RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652)

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4912)

RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (R4901)

bioavid Lateral Flow Milch/Milk (BL613-10, BL613-25)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Casein ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Casein-Protein in Lebensmitteln wie Backwaren, Backmischungen, nicht-hydrolysiertes milchbasierter Babynahrung, Eis, Getränken, Schokolade, Wein und Wurst.

2. Allgemeines

Kuhmilch enthält ca. 3,2 % Protein, das zu 10 % aus β -Lactoglobulin (Leitprotein der Molke) und zu 80 % aus Caseinen besteht. β -Lactoglobulin ist als Allergen vor allem für Kinder von größter Bedeutung, während beim Erwachsenen eher Casein als Allergen zu dominieren scheint.

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 muss Milch als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Casein-Protein beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Casein an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich) Komplex. Nicht gebundenes Konjugat wird nachfolgend durch Waschen entfernt. Der Nachweis von Casein erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Casein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Casein-Protein angegeben.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen).

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Extractor 2 Extraktor 2	blau	Konzentrat	2x	30 ml
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	grün	Konzentrat	10x	100 ml
Additive 1 Additiv 1	blau			2 g
Standard 1* Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	0,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	1,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	4,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	13,5 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Conjugate buffer Konjugat-Puffer	schwarz	gebrauchsfertig		7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

* Die Konzentrationsangaben der Standards berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung für Eis, Wein, Schokolade und Getränke (siehe 9.3) ergibt. So können die Casein-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Wird die Probenaufarbeitung mit dem Extraktor 2 angewandt (siehe 9.1 und 9.2), ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 100. Die aus der Standardkurve abgelesenen Werte müssen zusätzlich mit Faktor 5 multipliziert werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Waage
- Laborhandschuhe
- Zentrifuge, zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z. B. Brand 10742512)
- Wasserbad (60 °C und 100 °C)
- Faltenfilter (Porengröße 8-12 µm)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- Messzylinder
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. low binding Greiner bio-one Kat. Nr. 655101)
- gegebenenfalls: 8 Kanalpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996)

5.2. Reagenzien:

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 1 M Natronlauge (NaOH)
- 1 M Salzsäure (HCl)
- gegebenenfalls: Bovines Serum Albumin (BSA, z. B. Serva, Fraction V, Protease frei, Art. Nr. 11926.01)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

Der Extraktor 2 enthält β -Mercaptoethanol. Es wird empfohlen, **unter einem Abzug** zu arbeiten. Hautkontakt ist zu vermeiden (Handschuhe tragen!).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich; deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiry) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Eine bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten.
- Eine Extinktion kleiner 1,2 ($E_{450 \text{ nm}} < 1,2$) für Standard 5.
- Ein geruchloser Extraktor 2.

9. Probenextraktion

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Luftgetragene Allergene und unsaubere Laborausstattung können zu einer Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung nach jeder Probe gründlich zu reinigen,
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.

Der Allergen Extraktionspuffer liegt als 10fach Konzentrat vor. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vor der Verdünnung durch Erwärmen (Wasserbad 37 °C) zu lösen. Anschließend das Konzentrat gut mischen. Das

Konzentrat 1:10 (1+9) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte **Allergen Extraktionspuffer (AEP)** hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C oder vier Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C).

Um den finalen **Allergen Extraktionspuffer mit Zusatz von Additiv 1 (A-AEP)** herzustellen, müssen 1,35 g Additiv 1 in ein Becherglas eingewogen und mit 15 ml 1 M NaOH gelöst werden. Rühren bis sich das Additiv 1 gelöst hat. Dann 700 ml verdünnten Allergen Extraktionspuffer (AEP) in einen Messzylinder geben. Unter konstantem Rühren die 15 ml Additiv 1-Lösung dazugeben; eventuell vorhandene Reste der Additive 1-Lösung mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer (AEP) aufnehmen und in den Messzylinder überführen. Den mit Additiv 1 versetzten Allergen Extraktionspuffer (A-AEP) mit 1 M HCl auf pH 9 einstellen und mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer (AEP) auf 750 ml auffüllen.

750 ml A-AEP reichen für ca. 45 Proben. Der Puffer ist ca. 3 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Den A-AEP nicht mehr im Kühlschrank aufbewahren. Den Puffer verwerfen, sobald Kristalle ausfallen. Bei der Herstellung sind saubere Flaschen zu benutzen. Stäube dienen als Kristallisationskeime und sind zu vermeiden.

Der Extraktor 2 liegt als 2fach Konzentrat vor und muss 1:2 (1+1) mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden (z. B. 30 ml Extraktor 2 + 30 ml dest. Wasser). Der komplett verdünnte Extraktor 2 ist ausreichend für 15 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C). Weiterer Extraktor 2 kann bei R-Biopharm unter der Produktnummer R4613 bestellt werden.

9.1. Probenextraktion mit Extraktor 2 und Allergen Extraktionspuffer mit Additiv 1 (A-AEP)

- den A-AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen
- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren (Schokolade schmelzen) und gut mischen
- 1 g hiervon in ein frisches Gefäß überführen, mit 4 ml verdünntem Extraktor 2 versetzen, das Gefäß verschließen und gut mischen; für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- 16 ml erwärmten (60 °C) A-AEP zu der gekochten Probe geben

*Im Falle von **flüssigen** Proben, 1 ml Probe mit 4 ml verdünntem Extraktor 2 versetzen. Nach 10 min Kochen im Wasserbad und Abkühlen **15 ml** erwärmten (60 °C) A-AEP zu der gekochten Probe geben.*

- gründlich mischen (Vortex)
- anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) extrahieren
- abkühlen lassen (z. B. Eisbad)
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 g zentrifugieren); wenn möglich, sollte die Zentrifugation bei 4 °C durchgeführt werden
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren
- Probenextrakte innerhalb von 30 Minuten im Test einsetzen (Verdünnung siehe 10.2.) oder bis zur Verwendung im Test unverdünnt bei 2 - 8 °C lagern (Haltbarkeit etwa 3 Tage); nicht verwendete Extrakte können unverdünnt bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden

9.2. Probenextraktion mit Extractor 2, A-AEP und BSA für Mais und Maisprodukte sowie Matrices, die Walnüsse, Sonnenblumenkerne, Pinienkerne und Kürbiskerne enthalten

- den A-AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen
- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren (Schokolade schmelzen) und gut mischen
- 1 g hiervon in ein frisches Gefäß überführen, mit 0,5 g BSA, 4 ml verdünntem Extraktor 2 und 16 ml erwärmtem (60°C) A-AEP versetzen, das Gefäß verschließen und gut mischen

*Im Falle von **flüssigen** Proben, 1 ml Probe mit 4 ml verdünntem Extraktor 2 und **15 ml** erwärmten A-AEP versetzen.*

- für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe abkühlen lassen (z. B. Eisbad)
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 g zentrifugieren); wenn möglich, sollte die Zentrifugation bei 4 °C durchgeführt werden
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren

- Probenextrakte innerhalb von 30 Minuten im Test einsetzen (Verdünnung siehe 10.2.) oder bis zur Verwendung im Test unverdünnt bei 2 - 8 °C lagern (Haltbarkeit etwa 3 Tage); nicht verwendete Extrakte können unverdünnt bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden

Die nach 9.1. und 9.2. mittels Extraktor 2 und A-AEP erhaltenen Extrakte können auch im RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (R4912) und im RIDASCREEN®FAST Milk (R4652) eingesetzt werden.

9.3. Probenextraktion mit Allergen Extraktionspuffer (AEP) für Lebensmittel wie nicht-hydrolysierte milchbasierte Babynahrung, Eis, Wein, Schokolade, Getränke

Die im Folgenden beschriebene Extraktion ist nur für die genannten Lebensmittel geeignet, da diese auch ohne Extraktor 2, Additiv 1 und Kochschritt aufgearbeitet werden können.

- den AEP vor der Probenextraktion auf 60 °C erwärmen
- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren (Schokolade schmelzen) und gut mischen
- 1 g Probe abnehmen und mit 20 ml erwärmtem (60 °C) AEP versetzen; bei flüssigen Proben 1 ml Probe mit 19 ml erwärmtem AEP versetzen

1 ml Wein kann auch mit 9 ml erwärmtem AEP aufgearbeitet werden. Hierdurch erhöht sich die Sensitivität (LOD 0,12 mg/l; LOQ 0,25 mg/l).

- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubieren
- Probe abkühlen lassen (z. B. Eisbad)
- Probe filtrieren oder für 10 min bei mind. 2500 g zentrifugieren (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 g zentrifugieren); wenn möglich, sollte die Zentrifugation bei 4 °C durchgeführt werden
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren
- Probenextrakte innerhalb von 30 Minuten im Test einsetzen (siehe 10.2.) oder bis zur Verwendung im Test bei 2 - 8 °C lagern (Haltbarkeit etwa **1 Tag**); nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Das Konjugat (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Konjugat-Puffer mischen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Konjugat-Puffer verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Konjugat-Puffer ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der Waschpuffer liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Puffer hat bei 20 - 25 °C eine Haltbarkeit von vier Wochen.

10.2. Testdurchführung

Die mit Extraktor 2 und A-AEP hergestellten Extrakte müssen vor dem Einsatz im Test 1:5 (1+4) mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer (AEP) verdünnt werden (z. B. 100 µl Extrakt + 400 µl AEP). Die verdünnten Extrakte sind nur kurzzeitig haltbar (ca. 30 min).

Die nach 9.3. mit AEP hergestellten Extrakte können ohne weitere Verdünnung im Test eingesetzt werden.

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) bearbeitet werden. Dies verhindert einen zeitlichen Verzug durch das Pipettieren und gewährleistet so gleichmäßige Inkubationszeiten. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite, unbeschichtete Platte (z. B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101 oder Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) als Vorplatte verwendet werden. Alle Standards und Proben werden zunächst in die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und dann 100 µl hiervon zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

Es wird empfohlen, das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten ist zu vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe 10.1.) in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich. Die Auswertung sollte mittels cubic spline Funktion erfolgen. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden. Im Dokument „Compliance Criteria“, welches auf Anfrage erhältlich ist, sind Kriterien zur Beurteilung der Standardkurve enthalten. Zur Qualitätskontrolle sollten Testkontrollen benutzt werden.

Höhere Extinktionswerte ($E_{450\text{ nm}}$) der Standardkurve im Vergleich zu den Daten laut Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Casein-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 sollten weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Casein-Konzentration berücksichtigt werden.

Bitte beachten:

Extraktion mit A-AEP und Extraktor 2 (siehe 9.1. und 9.2.):

Beim Arbeiten nach dieser Vorschrift ist der Verdünnungsfaktor der Proben 100.

Ein Probenverdünnungsfaktor von 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt. Deshalb müssen die aus der Standardkurve abgelesenen Werte nur mit Faktor 5 multipliziert werden.

Extraktion mit AEP (siehe 9.3.):

Beim Arbeiten nach dieser Vorschrift ist der Verdünnungsfaktor der Proben 20.

Da ein Probenverdünnungsfaktor von 20 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde, kann die Casein-Konzentration direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Wird Wein nur mit 9 ml AEP extrahiert, muss die geringere Probenverdünnung von 1:10 bei der Berechnung der Casein-Konzentration berücksichtigt werden. Das aus der Standardkurve abgelesene Ergebnis ist mit dem Faktor 0,5 zu multiplizieren.

Einschränkungen bei der Analyse von rohem Fisch:

Roher Fisch bindet Casein stark. Aus diesem Grund kann die Wiederfindung auf 10 % reduziert sein. Das trifft auch auf gekochten Fisch zu, wenn Casein vor dem Kochen zugefügt wurde.

Generell:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Milchkomponenten, wie z. B. Lipide, in einer Probe enthalten sein können.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden; dies kann die Wiederfindung/Kreuzreaktivität beeinträchtigen. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet; andere Proben können hiervon abweichende Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrices sind im Validierungsbericht beschrieben.

Empfehlungen zur Gewährleistung einer hohen analytischen Sicherheit:

Jeden Probenextrakt in Doppelbestimmung analysieren.

Casein-freie und Casein-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen.

Stark saure oder stark alkalische Proben müssen vorab neutralisiert werden.

Weitere Applikationen:

- Extraktion von stark flüssigkeitsabsorbierenden Matrices mit RIDA[®] Extractor 2 (Art. Nr. R4613).
- Aufarbeitung von Lebensmitteln mit der RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098).
Diese Aufarbeitung ergibt ähnliche Ergebnisse wie die hier beschriebene mit A-AEP und Extractor 2. Die Probenextrakte können jedoch nicht im RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4912) und im RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652) eingesetzt werden.
- Extraktion von Wein (Verdünnung 1:10)

Für Informationen zur Durchführung der Analyse mittels Automaten sowie für weitere Produktinformationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN®FAST Casein

Brief information

RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of casein in food like bakery goods, cake and bread mix, non-hydrolyzed milk-based infant formula, ice cream, beverages, chocolate, wine and sausages.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (10 samples)..... approx. 20 min sample preparation (10 heated samples) .. approx. 30 min test implementation (incubation time).....30 min
Standard material:	The RIDASCREEN® standard material is casein from SIGMA Aldrich (Cat. No.: C5890).
Limit of detection:	Allergen extraction buffer 0.12 mg/kg (ppm) casein* 0.07-0.19 mg/kg (ppm) casein* RIDA® Extractor 2 0.71 mg/kg (ppm) casein* 0.41- 0.95 mg/kg (ppm) casein* <i>* abhängig von der untersuchten Matrix</i>
Limit of quantification:	Allergen extraction buffer 0.5 mg/kg (ppm) casein RIDA® Extractor 2 2.5 mg/kg (ppm) casein
Specificity:	The used antibodies specifically detect caseins of cow's milk. There is a cross reactivity to sheep's, goat's and buffalo's milk. Any further cross reactivity is not known. Especially, a cross reactivity to beta-lactoglobulin does not exist.

Cross reactivities of the antibodies used have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. maize bread) cross

reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP)-Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products for gliadin/gluten determination

RIDA[®] Extractor 2 (R4613)

RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652)

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4912)

RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (R4901)

bioavid Lateral Flow Milch/Milk (BL613-10, BL613-25)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Casein is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of casein in food like bakery goods, cake and bread mix, non-hydrolyzed milk-based infant formula, ice cream, beverages, chocolate, wine and sausages.

2. General

Cow`s milk contains 3.2 % proteins which consist of 10 % beta-lactoglobulin (leading protein of whey) and 80 % caseins. The most important allergen for children is beta-lactoglobulin while the caseins become to be dominant later in adults. Casein (lat. caseus = cheese) is a rough flaked curdling protein, which forms micells in the milk and precipitates under acidic conditions.

The allergen can be present as an ingredient or as a contamination in raw and cooked products. According to the regulation (EU) No. 1169/2011 milk and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to casein. By adding standards and samples to the wells, present casein will bind to the specific antibodies. In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase is added. This antibody conjugate is bound to the Ab-Ag-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The detection of casein takes place by adding substrate/chromogen solution. The enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the casein concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg casein.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 measurements (including standard analyses).

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
Extractor 2	Blue	Concentrate	2x	30 ml
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Additive 1	Blue			2 g
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	0.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	1.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	4.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	13.5 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Conjugate buffer	Black	Ready to use		7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

* The dilution factor 20 which results after sample preparation for ice cream, wine, chocolate and beverages (see 9.3.) has already been considered for the standard concentrations. In this case, the casein concentrations of the samples can directly be read from the standard curve.

If the sample preparation with Extractor 2 (see 9.1. and 9.2.) is used, it results in a dilution factor of 100. In this case, the concentrations read from the standard curve have to be multiplied additionally by factor 5.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- Scale
- Gloves
- Centrifuge, centrifugal vials (e.g. Brand 10742512)
- Water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F)
- Fluted filter (pore size 8-12 µm)
- Laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Graduated pipettes
- Graduated cylinder
- Variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

- If necessary: a further microtiter plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat. No. 655101)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 µl
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET (Z9996)

5.2. Reagents:

- Distilled or deionized water
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)
- 1 M hydrochloric acid (HCl)
- If necessary (see 9.2.): bovine serum albumin (BSA, e.g. Serva, fraction V, protease free, Art. No. 11926.01)

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instructions for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (SDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

The Extractor 2 contains beta-mercaptoethanol. It is recommended to work **under a chemical hood**. Avoid skin contact (wear gloves!).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen is light sensitive. Therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Any bluish coloration of the reddish Substrate/Chromogen before pipetting into the microplate wells.
- A value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 1.2$) for standard 5.
- Odorless Extractor 2.

9. Preparation of samples

Before starting and during the assay wear gloves. Airborne allergens and dirty laboratory equipment may lead to contamination of the assay. Hence it is recommended to take the following precautionary measures:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure

The Allergen extraction buffer is provided as a 10fold concentrate. Before dilution of the buffer concentrate, dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99 °F) completely and mix well. After that dilute the buffer concentrate 1:10 (1+9) with distilled or deionized water before use (e.g. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted **Allergen extraction buffer (AEP)** is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. twelve weeks or for four weeks at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

For the preparation of the final **Allergen extraction buffer containing Additive 1 (A-AEP)**, weigh 1.35 g of Additive 1 in a glass beaker and add 15 ml 1 M NaOH. Stir until the Additive 1 is solved. Then fill 700 ml diluted Allergen extraction buffer (AEP) in a measuring cylinder. Add the 15 ml Additive 1 solution by stirring constantly. Transfer any residues of the Additive 1 solution into the measuring cylinder by rinsing with diluted Allergen extraction buffer (AEP). Adjust the Additive 1 containing Allergen extraction buffer (A-AEP) to pH 9 with 1 M HCl and fill up to 750 ml with diluted Allergen extraction buffer (AEP).

750 ml A-AEP are sufficient for 45 samples. The buffer can be used for approx. 3 weeks at room temperature 20 - 25 °C (68 - 77 °F). Do not store again the A-AEP in the refrigerator. Discard the buffer if crystals are present. Use clean bottles when preparing the buffer. Particles of dust can initiate crystallization.

The Extractor 2 is provided as 2fold concentrate and has to be diluted 1:2 (1+1) with distilled or deionized water (e.g. 30 ml Extractor 2 + 30 ml dist. water). The complete diluted Extractor 2 is sufficient for 15 samples and can be used for

approx. 3 month at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Additional Extractor 2 can be ordered at R-Biopharm with the product number R4613.

9.1. Sample extraction with Extractor 2 and Allergen extraction buffer containing Additive 1 (A-AEP)

- heat the A-AEP to 60 °C (140 °F) before sample extraction
- homogenize (melt chocolate) and mix thoroughly a representative amount of the sample (5 - 50 g)
- transfer 1 g of it to a new vial, add 4 ml prepared Extractor 2, close the vial and mix well; cook it for 10 min at 100 °C (212 °F) in a water bath
- let the sample cool down shortly
- add 16 ml heated (60 °C / 140 °F) A-AEP to the cooked sample

*In case of **liquid** samples, add 4 ml prepared Extractor 2 to 1 ml sample. After 10 min cooking and cooling down, add 15 ml heated (60 °C) A-AEP to the cooked sample.*

- mix vigorously (shaker)
- extract for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath
- cool down samples (e.g. on ice water)
- filter sample or centrifuge for 10 min at > 2,500 g (alternative: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 g) for 10 min in a microcentrifuge); if possible, adjust the centrifuge to 4 °C (39 °F)
- transfer the supernatant into a fresh vial
- if the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally
- use the extract in the assay (dilution see 10.2.) within 30 minutes or store the undiluted extract at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until it is used (stability approx. three days); undiluted extracts not used can be stored few months at -20 °C (-4 °F)

9.2. Sample extraction with Extractor 2, A-AEP and BSA for corn and corn products as well as food containing walnuts, sunflower seeds, pumpkin seeds and pine nuts

- heat the A-AEP to 60 °C (140 °F) before sample extraction
- homogenize (melt chocolate) and mix thoroughly a representative amount of the sample (5 - 50 g)
- transfer 1 g of it to a new vial, add 0.5 g BSA, 4 ml prepared Extractor 2 and 16 ml heated (60 °C / 140 °F) A-AEP, close the vial and mix well;

*In case of **liquid** samples, add 0.5 g BSA, 4 ml prepared Extractor 2 and 15 ml heated A-AEP to 1 ml sample.*

- cook for 10 min at 100 °C (212 °F) in a water bath
- cool down samples (e.g. on ice water)
- filter samples or centrifuge for 10 min at > 2,500 g (alternative: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 g) for 10 min in a microcentrifuge); if possible, adjust the centrifuge to 4 °C (39 °F)
- transfer the supernatant into a fresh vial
- if the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally
- use the extract in the assay (dilution see 10.2.) within 30 minutes or store the undiluted extract at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until it is used (stability approx. three days); undiluted extracts not used can be stored few months at -20 °C (-4 °F)

The extracts prepared with Extractor 2 and A-AEP according to 9.1. and 9.2. can be also used with the RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (R4912) and RIDASCREEN®FAST Milk (R4652).

9.3. Sample extraction with Allergen extraction buffer (AEP) for food like non-hydrolyzed milk-based infant formula, ice cream, wine, chocolate, beverages

The following extraction procedure is only suited for the mentioned food since they can also be prepared without Extractor 2, Additive 1 and cooking step.

- heat the AEP to 60 °C (140 °F) before sample extraction
- homogenize (melt chocolate) and mix thoroughly a representative amount of the sample (5 - 50 g)
- transfer 1 g of it to a new vial and add 20 ml heated (60 °C / 140 °F) AEP; in case of **liquid** samples, take 1 ml sample and 19 ml heated AEP

1 ml wine can also be extracted with 9 ml heated AEP. Doing this increases the method's sensitivity (LOD 0.12 mg/l; LOQ 0.25 mg/l).

- mix well and incubate for 10 min at 60 °C (140 °F) by shaking occasionally
- cool down samples (e.g. on ice water)
- filter samples or centrifuge for 10 min at > 2,500 g (alternative: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed (> 10,000 g) for 10 min in a microcentrifuge); if possible, adjust the centrifuge to 4 °C (39 °F)
- transfer the supernatant into a fresh vial
- if the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally

- use the extract in the assay (see 10.2.) within 30 minutes or store the extract at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until it is used (stability approx. **one day**); extracts not used can be stored few months at -20 °C (-4 °C)

10. Test implementation

10.1. Test preparation

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

The Conjugate (bottle with red cap) is provided as a 11fold concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. The Conjugate should be mixed carefully before dilution. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in Conjugate buffer (e.g. 200 µl Conjugate + 2 ml Conjugate buffer, sufficient for 2 microtiter strips).

The Wash buffer is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled or deionized water (e.g. 100 ml Wash buffer + 900 ml dist. water). Prior to dilution, dissolve any crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted Wash buffer is stable for four weeks at 20 - 25 °C (68 -77 °F).

10.2. Test procedure

Extracts prepared with A-AEP and Extractor 2 must be diluted 1:5 (1+4) with diluted Allergen extraction buffer (AEP) before testing (e.g. 100 µl extract + 400 µl AEP). The diluted extracts are only shortly stable (approx. 30 min).

Extracts prepared with AEP according to 9.3. can be tested without any further dilution.

Do not use more than 3 strips (24 wells) at a time. This avoids a shift by pipetting and guarantees consistent incubation times. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101 or Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) should be used as a pre-plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate first (at least 150 µl per well); then quickly transfer 100 µl hereof to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

It is recommended to pipette the diluted Conjugate, the Substrate/Chromogen and the Stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or sample to separate duplicate wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted Wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two additional times.
4. Add 100 µl of the diluted Conjugate to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted Wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two additional times.
6. Add 100 µl of Substrate/Chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of the Stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 min after addition of Stop solution.

11. Results

Special software RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996) is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The calculation should be done by use of a cubic spline function. The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit. The document 'Compliance Criteria' which is available upon request provides criteria for evaluation of standard curves. For quality assurance, assay controls should be used.

Compared to the certificate, higher absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) for the standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or casein contamination.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5. Respect the additional dilution factor for calculating the casein concentration with further diluted samples.

Please note:

Extraction with A-AEP and Extractor 2 (see 9.1. and 9.2.):

When working in accordance with this extraction, the sample dilution factor is 100.

A dilution factor of 20 is already taken into account with the standard concentrations. Hence values read from the standard curve need to be multiplied with factor 5 only.

Extraction with AEP (see 9.3.):

When working in accordance with this extraction, the sample dilution factor is 20.

Hence a dilution factor of 20 is already taken into account with the standard concentrations the casein concentration can directly be read from the standard curve.

If wine is extracted with 9 ml AEP only, a lower dilution of 1:10 needs to be respected when calculating the casein concentration. Values read from the standard curve need to be multiplied with factor 0.5 in this case.

Limitations for the analysis of raw fish:

Raw fish strongly binds casein. Therefore, the recovery may only be 10 %. This is also true for cooked fish if casein is added before cooking.

In general:

Samples tested negative may still contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other milk compounds such as lipids for example.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. In processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented; this may have an impact on the recovery/cross reactivity. When analyzing a non-validated matrix, it is recommended to verify the results by spiking experiments.

For evaluation of the cross reactivity only one exemplary sample was analyzed, other samples may show a different result. All cross reactivities and exemplary analyzed matrices are described in the Validation Report.

Recommendations for guarantee of high analytical performance:

Each sample extract should be analyzed in duplicate.

Use also casein free and casein containing (spiked) samples as test controls.

Strong acidic or alkaline samples have to be neutralized prior to analysis.

Further applications:

- Sample extraction for heavily liquid absorbing matrices using RIDA[®] Extractor 2 (Art. No. R4613)
- Preparation of food samples with the RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098)
This sample preparation shows similar results as the method with A-AEP and Extractor 2. However, the so prepared extracts cannot be used with the RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4912) and in the RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652).
- Sample extraction for wine (dilution 1:10)

Details about automated assay procedures and further product information are available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

The data correspond to our present state of technology and provide information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com