

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST Senf/Mustard**

## **Art. No. R6152**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Senf

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of mustard

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

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

E-Mail : [info@r-biopharm.de](mailto: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 Senf/Mustard (Art. Nr.: R6152) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Senf in Ketchup, Wurst und Frischkäse.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ..... ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit) .....30 min
Nachweisgrenze:	0,1 mg/kg (ppm) Senfmehl; zwischen 0,08 – 0,11 mg/kg (ppm) abhängig von der Matrix
Bestimmungsgrenze:	0,5 mg/kg (ppm) Senfmehl
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist auf Senfmehl (gelber, brauner und schwarzer Senf) kalibriert.
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch verschiedene Senf-Arten (gelben, braunen, schwarzen Senf).  Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Kidneybohnen, Pintobohnen, weißen Bohnen und Leinsamen sowie Rapssamen und anderen Samen von Kreuzblütlern ( <i>Brassicaceae</i> ).

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. Weitere Informationen sind im aktuellen Validierungsbericht enthalten.

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 <http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik> abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## **Produktangebot**

SureFood<sup>®</sup> PCR ALLERGEN Mustard

Bioavid Lateral Flow Senf/Mustard (Art. Nr. BL603-10 / BL603-25)

### **1. Verwendungszweck**

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Senf/Mustard ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Senf in Ketchup, Wurst und Frischkäse.

### **2. Allgemeines**

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 muss Senf als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein.

### **3. Testprinzip**

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Senf-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Senf-Protein 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 Senf-Protein 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 Senf Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Senfmehl angegeben.

## 4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig	-	48 Kavitäten
<b>Allergen extraction buffer</b> Allergen Extraktionspuffer	grün	<b>Konzentrat</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Standard 1*</b> Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0,0 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 2*</b> Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	0,5 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 3*</b> Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	1,5 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 4*</b> Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	4,5 mg/kg	1,3 ml
<b>Standard 5*</b> Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	13,5 mg/kg	1,3 ml
<b>Wash buffer</b> Waschpuffer	braun	<b>Konzentrat</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	gebrauchsfertig	-	6 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig	-	10 ml
<b>Stop solution</b> Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig	-	14 ml

\*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Senf-Konzentration der Probe direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen (alternativ Papierfaltenfilter)
- Schüttler
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten

- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

## 5.2. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

## 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 (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de).

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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 Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

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

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlich gefärbten Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 1,2 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für Standard 5

## 9. Probenvorbereitung

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, Glasgefäße oder Spatel müssen vor und nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Eireste zu entfernen und Kontamination zu vermeiden.

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor der Verdünnung des Konzentrats evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C vollständig lösen und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20 - 25 °C.

### 9.1. Probenaufarbeitung für alle Proben

- 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen
- davon 1 g einwiegen und mit 20 ml verdünntem Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte schon eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- bzw. bei flüssigen Proben 1 ml Probe mit 19 ml verdünntem Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte schon eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C inkubieren, anschließend abkühlen
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl Überstand oder Filtrat pro Kavität im Test einsetzen

#### **Anmerkung:**

**Bei der Analyse von reinen Gewürzen kann es zu Wiederfindungen deutlich unter 100 % kommen, da Inhaltsstoffe der Gewürze stören können. Bei Gewürzen ist die Wiederfindung daher in Spikeversuchen mit und ohne Zusatz von 1 g Magermilchpulver (Lebensmittelqualität) zu überprüfen.**

**Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 5 Tage haltbar.**

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C vollständig lösen und gut mischen. Das Konzentrat vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20 - 25 °C.

## 10.2. Testdurchführung

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. 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, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

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

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl des Standards bzw. der vorbereiteten Proben in Duplikaten 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen 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 RIDA®SOFT 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‘ sind Kriterien zur Beurteilung von Standardkurven enthalten. Zur Qualitätskontrolle sollten Testkontrollen benutzt werden.

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

### **Bitte beachten:**

Beim Arbeiten nach der angegebenen Probenvorbereitung gilt der Verdünnungsfaktor 20. Die Allergen-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden (der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe 4.\*)).

### **Generell:**

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass andere Komponenten, 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.

Allergene in hitzebehandelten Proben werden nicht vollständig von dem verwendeten Antikörper erfasst. Das Ergebnis der Wiederfindung hängt von der Art und Dauer der Hitzebehandlung ab, so dass bei hoch erhitzten Proben die Wiederfindung stark reduziert sein kann.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet, andere Proben können verschiedene Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrices sind im aktuellen Validierungsbericht beschrieben.

Der Proteinanteil und die Proteinzusammensetzung können in verschiedenen Senfsorten unterschiedlich sein. Verschiedene Sorten können unterschiedliche Ergebnisse liefern, da eine Kalibrierung des Tests gegen exemplarische Senfsorten vorliegt. Der Proteingehalt des Standardmaterials ist im Validierungsbericht angegeben und kann zur Umrechnung auf Protein genutzt werden.

## Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, wird empfohlen:

- bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert auf neutral einzustellen
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Dotierungsversuche durchzuführen
- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR von SureFood<sup>®</sup> durchzuführen
- bei der Analyse mittels Automaten (z.B. Thunder Bolt<sup>®</sup> / Bolt) sich an [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de) zu wenden.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto: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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

# RIDASCREEN®FAST Senf/Mustard

## Brief information

RIDASCREEN®FAST Senf/Mustard (Art. Nr.: R6152) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of mustard in ketchup, sausage and cream cheese.

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, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) .....approx. 20 min test implementation (incubation time) .....30 min
Limit of detection:	0.1 mg/kg (ppm) mustard flour; between 0.08 – 0.11 mg/kg (ppm) depending on the matrix
Limit of quantification:	0.5 mg/kg (ppm) mustard flour
Standard material:	The RIDASCREEN® standard material is calibrated on mustard flour (yellow, brown and black mustard).
Specificity:	The antibodies used in the test specifically detect different kinds of mustard (yellow, white, brown, black mustard).  Cross reactivity to kidney beans, pinto beans, white beans, linseed as well as rapeseed and seeds from different cruciferous plants ( <i>Brassicaceae</i> ).

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. corn bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments. Further information is described in the updated validation report.

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 from the website <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis>.

## **Related products**

SureFood<sup>®</sup> PCR ALLERGEN Mustard

Bioavid Lateral Flow Senf/Mustard (Art. Nr. BL603-10 / BL603-25)

### **1. Intended use**

RIDASCREEN<sup>®</sup>FAST Senf/Mustard is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of mustard in ketchup, sausage and cream cheese.

### **2. General**

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, mustard and products thereof must be declared on food labels.

### **3. Test principle**

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to mustard proteins. By adding standards and samples to the wells, mustard protein present 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 mustard protein takes place by adding substrate/chromogen. The 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 mustard proteins concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg mustard flour.

## 4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use	-	48 wells
Allergen extraction buffer	Green	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0.0 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	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 ml
Conjugate	Red	Ready to use	-	6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use	-	10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use	-	14 ml

\*) **The dilution factor of 20** for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the mustard concentration of samples can directly be read from the standard curve.

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1. Equipment

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal vials (alternatively fluted paper filter)
- shaker
- water bath
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

### 5.2. Reagents

- distilled or deionized water

## 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 (MSDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 7. Storage instructions

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

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 red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 1.2 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.8$ ) for standard 5

## 9. Preparation of Samples

Working devices such as a mill, glass vials or spatulas must be cleaned before and after each sample preparation to remove any remains of egg and to avoid contamination.

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 heated buffer concentrate 1:10 (1+9) with distilled water before use (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. four weeks.

## 9.1. Sample preparation for all samples

- grind 5 g of the sample carefully and mix thoroughly
- weigh 1 g of the sample and add 20 ml diluted Allergen Extraction buffer (the extraction buffer should already have a temperature of approx. 60 °C (140 °F))
- or add 19 ml of the diluted Allergen Extraction buffer to 1 ml liquid sample (the extraction buffer should already have a temperature of approx. 60 °C (140 °F))
- mix intensively and incubate for 10 min at 60 °C (140 °F), afterwards cool down
- centrifuge: 10 min, at least 2500 g, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl of the supernatant or filtrate per well in the assay

### Remark:

**The analysis of pure spices may lead to recoveries considerably below 100 %, due to interferences of the spice ingredients. For spices recoveries should be verified by spiking with and without addition of 1 g skim milk powder (food-grade).**

**The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 5 days.**

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before dilution dissolve crystals that may have been formed in a water bath at 37 °C (99 °F) completely. Before use the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted wash buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for approx. four weeks.

### 10.2. Test procedure

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

Do not use more than 3 strips (24 wells) at a time. 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 to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards

and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and then quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared sample in duplicate to separate 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 in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µl of the conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually 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 wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl of the substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually 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 minutes after addition of stop solution.

## 11. Results

A special software, the RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.NET (Art. Nr. Z9996) is available for evaluation of the RIDASCREEN<sup>®</sup> 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' provides criteria for evaluating standard curves. For quality assurance assay controls should be used.

In comparison with the certificate, higher values of the absorbance ( $A_{450\text{ nm}}$ ) for the calibration curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.



## **Please note:**

When working according to the described sample preparation, the dilution factor is 20. The allergen concentration can be read directly from the standard curve (the sample dilution factor of 20 is already taken into account for the standard concentrations (see 4. \*)).

## **In general:**

Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like 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.

Allergen containing samples that have been heat treated show a reduced recovery because the proteins denature and are no longer recognized by the antibody. The reduction in recovery depends strongly on the temperature and the duration of the heat treatment. If samples are heat treated at high temperature the recovery can be significantly reduced.

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

The protein content and the protein composition may vary considerably between different mustard species. Therefore, different varieties may produce different results, since exemplary varieties were used for calibration. The protein content of the standard material is described in the validation report and can be used for the calculation to protein.

## **Recommendation:**

In order to ensure a high analytical performance it is recommended to:

- Adjust the pH to a neutral value for extremely acidic or alkaline samples
- Use allergen-free and allergen containing (spiked) samples as test controls
- Carry out spiking experiments for an accurate and correct procedure
- Analyze each sample material in duplicates
- Perform SureFood<sup>®</sup> PCR to confirm results
- Contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de) if automates (e.g. ThunderBolt<sup>®</sup> / Bolt) are used

Further product information and application notes, please contact [sales@r-biopharm.de](mailto:sales@r-biopharm.de).

The data corresponds to our present state of technology and provides 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](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321