

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC

REF R9002

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Aflatoxin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of aflatoxin

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:

R-Biopharm AG Zentrale
Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

R-Biopharm AG switchboard
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de

Order department
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb
E-Mail: info@r-biopharm.de

Marketing & sales
E-mail: sales@r-biopharm.de

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

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC (Art. Nr.: R9002) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin in Mais, braunem Reis und Futtermitteln.

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

Probenvorbereitung: extrahieren, filtrieren, verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 10 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 15 min

Nachweisgrenze: Mais 1,5 µg/kg (ppb)
Futtermittel 5,3 µg/kg (ppb)

Wiederfindungsrate: Mais 70 - 120 %
(natürlich kontaminierte Proben - Trilogy®) Brauner Reis 70 - 120 %
Futtermittel 70 - 100 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch. 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.

Produktangebot

RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 (R1211)
RIDASCREEN® Aflatoxin Total (R4701)
RIDASCREEN®FAST Aflatoxin (R5202)
EASI-EXTRACT® Aflatoxin (RBRRP71/RBRRP70N)
RIDA® Aflatoxin column (R5001/R5002)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin in Mais, braunem Reis und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *nomius*. Diese Pilzarten kommen in feuchten tropischen Gebieten vor und die Kontamination der pflanzlichen Lebensmittel erfolgt in den Anbauländern. Aflatoxine sind hochtoxisch und gehören zu den stärksten natürlich vorkommenden kanzerogenen Substanzen.

Aflatoxin B₁, das fast immer gemeinsam mit Aflatoxin B₂, G₁ und G₂ vorkommt, wird vor allem in Getreide, Mais, Baumwollsamensamen und verschiedenen Nüssen gefunden.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standard bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Aflatoxin (Enzymkonjugat) und anti-Aflatoxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin konkurrieren um die Aflatoxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Aflatoxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Hinzugegeben wird Substrat/Chromogen, gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Aflatoxin Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können max. 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Microtiter plate M Mikrotiterplatte M	-	gebrauchsfertig	48 Kavitäten
Standard 1^{*)} Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L 1,3 ml
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	3 ml
Antibody Antikörper	schwarz	gebrauchsfertig	3 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig	10 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffersalz Tween		Salz zum Auflösen	
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig	14 ml

*) Nur Standard 1 (0 µg/L) ist im Testkit enthalten. Die B/B₀-Werte der Chargin-spezifischen Standardkurve sind auf dem im Testkit befindlichen QC-Zertifikat angegeben. Für die Berechnung der Ergebnisse siehe 11. Auswertung.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml
- zur Probenvorbereitung: Filtertrichter und Auffanggefäß (50 ml) aus Glas
- Schüttler
- Labor- oder Getreidemühle
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- 50 µl, 100 µl und 1000 µl Mikropipetten

für USDA/GIPSA Extraktionsmethode

- Ultra-Turrax (oder Vergleichbares)
- Filterspritze (JM 1000 oder Vergleichbare)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Methanol
- 70 % Methanol: 70 ml Methanol (100 %) mit 30 ml dest. Wasser mischen

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.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Die Dekontamination der Glasgeräte und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

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) darf das Testkit nicht mehr verwendet werden.

Eine Verdünnung oder Verunreinigung der Reagenzien kann zu einem Verlust an Sensitivität führen.

Der Test kann bei entsprechender Lagerung mindestens bis zum Verfallsdatum (angegeben auf der Kitpackung) für eine ordnungsgemäße Analyse eingesetzt werden.

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- Bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahme-Vorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen.

Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur durchführen.

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 25 ml 70 % Methanol *) hinzufügen
- 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
wir empfehlen für die Extraktion die Verwendung eines Schüttlers oder Mixers
- den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter (oder vergleichbaren Filter) filtrieren
- 1 ml des Filtrats mit 1 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, aber dazu muss das Volumen des Methanol/Wasser-Gemisches angepasst werden, z. B. 10 g in 50 ml 70 % Methanol

USDA/GIPSA Extraktionsmethode

- 50 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 250 ml 70 % Methanol hinzufügen
- die Probe 2 min mit einem Ultra-Turrax (oder Vergleichbarem) homogenisieren oder 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt durch eine Filterspritze (JM 1000 oder Vergleichbare) filtrieren: dazu den Probenextrakt bis etwa 1 cm unterhalb des Randes in den Spritzenkörper einfüllen; mit dem Spritzenkolben ca. 1,5 ml des Extraktes durch den Filter drücken
- den filtrierten Extrakt in einem sauberen Gefäß auffangen
- 1 ml des Filtrats mit 1 ml dest. oder deionisiertem Wasser verdünnen
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung

Proben, die außerhalb des Messbereichs mit Werten $> 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) gemessen werden, sind für eine genaue Bestimmung z.B. 1:3 (1+2) mit Methanol/Wasser (35/65) weiter zu verdünnen. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor 3 ist entsprechend bei der Kalkulation zu berücksichtigen (d.h. die Ergebnisse müssen noch mit 3 multipliziert werden).

10. Testdurchführung

10.1 Testvorbereitungen

1. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.
2. Die spezifische Reaktion startet erst mit der Zugabe des spezifischen Antikörpers. Wenn eine einfache Pipette eingesetzt wird, sollten nicht mehr als drei Streifen pro Testansatz eingesetzt werden. Bis zu 6 Streifen können bei Verwendung von Multistep-Pipetten eingesetzt werden.
3. Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

Der **Aflatoxin Standard 1 (0 $\mu\text{g}/\text{L}$)** liegt gebrauchsfertig vor. Die B/B₀ Werte der Standards 2 - 7 (2, 4, 10, 20, 50, 100 ppb) werden auf dem im Test befindlichen QC-Zertifikat angegeben. Die Standardkurve wird anhand dieser Werte mit der **RIDASOFT® Win.NET** (Art. Nr. Z9996FF) berechnet (siehe 11. Auswertung). Der Verdünnungsfaktor 10 für die Proben wurde in der Berechnung bereits berücksichtigt.

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Pufferbriefchen (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen. Die Lösung (10fach Konzentrat) ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

10.2 Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein komplettes Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Daher sollte die Abarbeitung zügig erfolgen. Für die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ist ein gleichmäßiges Waschen der Kavitäten erforderlich. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb immer einhalten.

Bei allen Inkubationsschritten direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten abdecken.

Es wird empfohlen das Konjugat, den Antikörper, das Substrat/Chromogen und die Stopp-Lösung 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 den Standard und Proben benötigt werden. Die Positionen des Standards und der Proben protokollieren.
2. 50 µl Standard oder vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für Standard oder Probe jeweils neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 10 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit Hilfe einer Waschflasche oder Multikanal-Pipette (250 µl pro Kavität) mit Waschlösung (siehe 10.1.) waschen, die Kavitäten leeren und die Restflüssigkeit entfernen. Diesen Waschvorgang noch zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 5 min (+/- 0,5) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp-Lösung messen.

11. Auswertung

Zur Berechnung der Ergebnisse müssen die für Standard 1 (0 ppb) gemessene Absorption sowie die im QC-Zertifikat angegebenen B/B₀-Werte für die Standards 2 - 7 (2, 4, 10, 20, 50, 100 ppb) in die **RIDASOFT® Win.NET** (Art. Nr. Z9996FF) eingegeben werden. Daraus errechnet das Programm die entsprechende Standardkurve und die resultierenden Gehalte an Aflatoxin in den Proben.

Bitte beachten:

Die RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996FF) ist bei R-Biopharm erhältlich.









Für weitere Produktinformationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2005-05-04	Allgemeine Überarbeitung
2007-05-18	Allgemeine Überarbeitung
2010-01-27	Allgemeine Überarbeitung

Symbolerklärung

- Allgemeine Symbole:

	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	Verfallsdatum (YYYY-MM)
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Testbestimmungen
	Herstelldatum (YYYY-MM)
	Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

Der Anwender trägt das alleinige Risiko bei der Verwendung der Produkte und Dienstleistungen der R-Biopharm AG.

Die R-Biopharm AG gewährleistet, dass ihre Produkte und Dienstleistungen allen von ihr festgelegten Qualitätskontrollstandards entsprechen. Die R-Biopharm AG wird nach ihrer Wahl Komponenten, Produkte oder wiederkehrende Dienstleistungen austauschen oder ausbessern, die sich innerhalb produktspezifischer Gewährleistungsfristen oder Ablaufdaten als mangelhaft in der Verarbeitung oder im Material erweisen und die sich nach der Prüfung und im Ermessen der R-Biopharm AG als mangelhaft erweisen.

Diese Gewährleistung tritt an die Stelle jeglicher Gewährleistungen hinsichtlich Qualität, Beschreibung, Eignung für einen bestimmten Zweck, Marktgängigkeit, Produktivität oder anderer Spezifikationen. Die R-Biopharm AG ist in keiner Weise verantwortlich für jegliche Nutzung ihrer Produkte und weist hiermit alle anderen ausdrücklichen oder stillschweigenden Rechtsbehelfe ab, bzw. übernimmt ausdrücklich keine, Garantien, Gewährleistungen oder Haftungen, die sich aus dem Gesetz oder anderweitig ergeben. Die R-Biopharm AG übernimmt des Weiteren keine Haftung für entgangenen Gewinn oder Schäden – direkt, indirekt oder anderweitig – an Personen oder Eigentum im Zusammenhang mit der Verwendung ihrer Produkte oder Dienstleistungen.

Diese Haftungsregelung kann nur durch ein schriftliches, von einem autorisierten Vertreter der R-Biopharm AG unterzeichnetes Dokument verlängert, geändert oder ausgetauscht werden.

RIDASCREEN® FAST Aflatoxin SC

Brief information

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC (Art. No.: R9002) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin in corn, brown rice and feed.

All reagents required for the enzyme immunoassay, including standard, are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 48 determinations (including standard). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: extraction, filtration, dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)..... approx. 10 min
test implementation (incubation time).....15 min

Limit of detection: Corn1.5 µg/kg (ppb)
Feed5.3 µg/kg (ppb)

Recovery rate: Corn 70 - 120 %
(naturally contaminated samples - Trilogy®) Brown rice70 - 120 %
Feed 70 - 100 %

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice. 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.

Product offer

RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 (R1211)
RIDASCREEN® Aflatoxin Total (R4701)
RIDASCREEN®FAST Aflatoxin (R5202)
EASI-EXTRACT® Aflatoxin (RBRRP71/RBRRP70N)
RIDA® Aflatoxin column (R5001/R5002)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Aflatoxin SC is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin in corn, brown rice and feed.

2. General

Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species *Aspergillus flavus*, *parasiticus* and *nomius*. These fungi occur in humid tropical areas and the contamination of vegetable food takes place in the cultivable countries. Aflatoxins are highly toxic and belong to the strongest natural occurring carcinogenic substances.

Aflatoxin B₁, which is generally present together with aflatoxin B₂, G₁ and G₂, can be detected in cereals, corn, cotton-seed and some nuts.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin antibodies. Aflatoxin standard or sample solutions, aflatoxin enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free aflatoxin and aflatoxin enzyme conjugate compete for the aflatoxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound 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 inversely proportional to the aflatoxin concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format	Volume
Microtiter plate M	-	ready to use	48 wells
Standard 1^{*)}	white	ready to use	0 µg/L 1.3 ml
Conjugate	red	ready to use	3 ml
Antibody	black	ready to use	3 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	brown	ready to use	10 ml
Wash buffer salt Tween		Dissolve the salt	
Stop solution	yellow	ready to use	14 ml

*) Only standard 1 (0 µg/L) is included in the test kit. The standard curve (B/B₀) is provided with the QC certificate of the test kit. For the calculation of results see 11. Results.

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Graduated cylinder (plastic or glass) 100 ml
- Glassware for preparing sample extract: filter funnel and 50 ml flask
- Shaker
- grinder (mill)
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- 50 µl, 100 µl and 1000 µl micropipettes

for USDA/GIPSA extraction method:

- ultra-turrax (or equivalent)
- filter syringe (JM 1000 or equivalent)

5.2 Reagents

- Distilled or deionized water
- Methanol
- 70 % methanol solution: prepare 70 % methanol solution by mixing 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction 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.

Ensure the proper and responsible disposal of all reagents and materials after their use. For disposal, please adhere to national regulations.

Decontamination of the glassware and aflatoxin solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

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.

Do not use the test kit after the expiration date (see test kit label).

Dilution or adulteration of these reagents may result in loss of sensitivity

The test kit can be regularly used at least up to the expiry date (indicated on the kit label), if stored correctly.

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

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

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place, protected from light. A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

Bring all reagents and samples to room temperature (20 - 25 °C) before use and perform sample preparation at room temperature.

- weigh 5 g of ground sample into a suitable container and add 25 ml of 70 % methanol *)
- shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
we recommend the extraction by using a shaker or blender
- filter the extract through Whatman No. 1 filter (or equivalent)
- dilute 1 ml of the obtained filtrate with 1 ml of distilled or deionized water
- use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test

*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/water must be adapted accordingly, e.g.: 10 g in 50 ml of 70 % methanol

USDA/GIPSA extraction method:

- weigh 50 g of ground sample into a suitable container and add 250 ml of 70 % methanol
- blend the sample by ultra-turrax (or equivalent) for two minutes or shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
- filter the extract using a filter syringe (JM 1000 or equivalent): pour the sample extract into the syringe within 1 cm from the top; using the plunger, push approx. 1.5 ml of the extract through the syringe filter
- collect the filtered extract into a clean tube
- dilute 1 ml of the filtrate with 1 ml of distilled or deionized water
- use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test

Remark:

Samples found out of range > 100 µg/kg (ppb) have to be further diluted, e.g. 1:3 (1+2) with methanol/water (35/65), in order to get a correct result. The resulting dilution factor 3 has to be taken into account when calculating the result (the results need to be multiplied by 3).

10. Test implementation

10.1 Test preparation

1. Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.
2. The specific reaction starts with the addition of the specific antibody. Nevertheless, not more than three strips should be applied to the test, when a single step pipette is used. More strips (up to 6) could be applied, when a multistep pipette is used.
3. Return all reagents to 2 - 8 °C (35 - 46 °F) immediately after use.

The **aflatoxin standard 1 (0 µg/L)** is provided ready to use. B/B₀-values of Aflatoxin standards 2 - 7 (2, 4, 10, 20, 50 and 100 ppb) are reported on the QC certificate of the test. The standard curve is calculated with the **RIDASOFT® Win.NET** (Art. No. Z9996FF) (see 11. Results) according to those values. The dilution factor 10 for the sample has been considered in this calculation.

As **washing buffer** a PBS-Tween buffer is needed, please use the washing buffer salt (pouch) contained in the kit (see 4.). Please use the buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready-to-use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks when stored at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternatively: Dissolve the contents of the envelope in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. The 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks when stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer.

10.2 Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry up completely and avoid prolonged intervals between the working steps. Therefore, the processing should be done quickly. Carefully follow the recommended washing procedure as outlined in the test procedure. Reproducibility in any EIA is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore, covering the microtiter plates is recommended. 1

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 the standard and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 µl of standard or prepared sample into separate wells; use a new pipette tip for the standard or each sample.
3. Add 50 µl of conjugate to the bottom of each well.
4. Add 50 µl of antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Dump the liquid out of the wells into a sink. Tap the microwell holder upside down onto a clean filter towel (three times in a row) to remove all remaining liquid from the wells. Using a wash bottle or multichannel pipette, fill the wells (250 µl per well) with washing buffer (see 10.1.). Empty the wells again and remove all remaining liquid. Repeat the washing step two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 5 min (+/- 0.5) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 minutes.

11. Results

For calculation of results you need to transfer the measured absorbance for standard 1 (0 ppb) as well as the B/B₀ values for standards 2 - 7 (2, 4, 10, 20, 50, 100 ppb) provided with the test kit QC certificate, into the **RIDASOFT® Win.NET** (Art. No. Z9996FF). From this the software program calculates the standard curve and the content of aflatoxin in the samples.

Please note:

The RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF) can be ordered from your local distributor.

Further product information, please contact your local distributor or R- Biopharm at this address: sales@r-biopharm.de.

Version overview

Version number	Chapter and title
2005-05-04	General revision
2007-05-18	General revision
2010-01-27	General revision

Explanation of symbols

- General symbols:



Follow the instructions for use



Batch number



Expiry date (YYYY-MM)



Storage temperature



Article number



Number of test determinations



Manufacturing date (YYYY-MM)



Manufacturer + address

Disclaimer

The user assumes all risk in using R-Biopharm AG's products and services.

R-Biopharm AG will warrant that its products and services meet all quality control standards set by R-Biopharm AG, and R-Biopharm AG will, at its option, replace or repair any components, product or repeat services which prove to be defective in workmanship or material within product specific warranty periods or expiration dates and which our examination shall disclose to our satisfaction to be defective as such.

This warranty is expressly in lieu of all other warranties, expressed or implied, as to quality, description, fitness for any particular purpose, merchantability, productiveness, or any other matter. R-Biopharm AG shall be in no way responsible for the proper use of its products and hereby disclaims all other remedies, warranties, guarantees or liabilities, expressed or implied, arising by law or otherwise, and it shall have no liability for any lost profits or damage, direct, indirect or otherwise, to person or property, in connection with the use of any of its products or services.

This warranty shall not be extended, altered or varied except by a written instrument signed by an authorized representative of R-Biopharm AG.

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

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dr. Ralf M. Dreher

Vorstand / Board of Management:

Christian Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Hans Frickel, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321