

RIDASCREEN[®] FAST Lupine

Art. Nr. R6102

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Lupinenproteinen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of lupine proteins

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

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 Lupine (Art. Nr.: R6102) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Süßlupinenproteinen in Lebensmitteln wie Getränke (Saft, Wein, Bier), Wurst- und Fleischwaren, Backmischungen, Backwaren, Nudeln, Schokolade, Milcherzeugnissen und Eis.

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:	0,7 mg/kg (ppm) Lupinenprotein (abhängig von der Matrix)
Bestimmungsgrenze:	1 mg/kg (ppm) Lupinenprotein
Spezifität:	Der eingesetzte Antikörper erkennt spezifisch Proteine der Lupine, inklusive des γ -Conglutin sowie alle im Lebensmittel- und Futtermittelbereich relevanten europäischen Süßlupinenspezies (<i>Lupinus albus</i> , <i>luteus</i> und <i>angustifolius</i>). Es besteht eine leichte Kreuzreaktivität zu Kichererbsen, Sojamehl, gerösteten Haselnüssen, Kurkuma, Curry und Bockshornklee. Weitere Information zu Kreuzreaktivitäten sind im aktualisierten Validierungsbericht enthalten

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.

Produktangebot

SureFood® ALLERGEN ID Lupin (Art. Nr. S3111)

SureFood® ALLERGEN QUANT Lupin (Art. Nr. S3211)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Lupine ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Süßlupinenproteinen in Getränken (Saft, Wein, Bier), Wurst- und Fleischwaren, Backmischungen, Backwaren, Nudeln, Schokolade, Milcherzeugnissen und Eis.

2. Allgemeines

Die großkörnigen Süßlupinen enthalten 35 bis 42 % Rohprotein in den Samen. Sie werden in erster Linie als Eiweißlieferanten, alternativ zu Soja- und zu tierischen Produkten, für die menschliche und tierische Ernährung verwendet. Wegen ihres hohen Wasserbindungsvermögens können sie auch in Brot und anderen Backwaren als Ersatz für Ei eingesetzt werden. Dies erhöht die Frische und Haltbarkeit der Produkte. Daneben findet Lupinenmehl in diätetischen Lebensmitteln als Ersatz für Weizen-, Roggen- und Gerstenmehl Verwendung. In Frankreich dürfen Weizenmehle bis zu 10 % Lupinenmehl ohne weitere Deklaration enthalten. Da Lupine allergische Reaktionen hervorrufen kann, sollte ihr Vorkommen in Lebensmitteln gekennzeichnet werden. Des Weiteren besteht bei Erdnuss-Allergikern die Möglichkeit einer klinischen Kreuzsensibilisierung. Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach der **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** müssen Lupine als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Lupinen-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet

vorhandenes Lupinen-Protein an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Konjugat 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 Lupinen-Protein erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Konjugat 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 Lupinen-Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Lupinen-Protein angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	grün	Konzentrat	10x	100 ml
Standard 1* Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	1 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	3 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	9 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	27 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop Solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der normalen Probenvorbereitung ergibt. So können die Lupinprotein-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Schüttler
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- variable 20 - 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.

Dieser 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.

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 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 rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 5

9. Probenvorbereitung

Spuren von Lupine aus früheren Analysen müssen unbedingt entfernt werden! Die Aufarbeitung der Proben sollte daher in gut gespülten oder neuen Glasgefäßen vorgenommen werden.

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

- 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen
- 1 g Probe abnehmen und mit 20 ml verdünntem Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- abkühlen lassen (z.B. Eisbad), zentrifugieren für 10 min / 2500 g (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren) und/oder filtrieren
- den Überstand dekantieren (trübe Proben mit einem Papierfaltenfilter filtrieren)
- 100 µl Überstand oder Filtrat pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar.

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 soviel Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml dest. Wasser, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** 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 Waschpuffer 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 Microtiter 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 Multistep-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 der Standards bzw. der vorbereiteten Proben 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 viermal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes 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 viermal wiederholen.
6. Je 100 µl der rötlich gefärbten 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 des 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.

Höhere Extinktionswerte (E450 nm) der Eichkurve im Vergleich zu den Daten lt. Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Allergen-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten (E450 nm) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen.

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.*)). Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:20 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Lupinen-Konzentrationen mit berücksichtigt werden.

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.

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

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen
- Bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung sollten Spike Versuche durchgeführt werden.
- zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR von SureFood[®] durchzuführen
- sollte eine Analyse mittels dem ChemWell[®] oder GEMINI Automaten erfolgen, wenden Sie sich für weitere Informationen bitte an info@r-biopharm.de.

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®]FAST Lupine

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Lupine (Art. No.: R6102) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sweet lupine proteins in food (e.g. juices, wine, beer, sausages, noodles, chocolate, bakery products or ice cream).

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:	0.7 mg/kg (ppm) lupine protein (depending on the matrix)
Limit of quantification:	1 mg/kg (ppm) lupine protein
Specificity:	The antibody specifically detects sweet lupine proteins, including the γ -conglutin as well as all European species of sweet lupines (<i>Lupinus albus</i> , <i>luteus</i> and <i>angustifolius</i>) relevant in the food and feed industry.

A slight cross reactivity exists to chickpea, soy flour, roasted hazelnut, curcuma, curry and fenugreek. Further Information on cross-reactivities are contained in the updated validation report

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.

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

SureFood® ALLERGEN ID Lupin (Art. Nr. S3111)

SureFood® ALLERGEN QUANT Lupin (Art. Nr. S3211)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Lupine is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of lupine proteins in food (e.g. juices, wine, beer, sausages, noodles, chocolate, bakery products or ice cream).

2. General

The macroscopic granular sweet lupines contain 35 - 42 % proteins in the seeds. Lupines are generally used as a natural protein source as an alternative to soy- and animal products in human food and animal feed. They are able to bind water in food and therefore can be used as a replacement of egg in bread and bakery products. This increases the freshness and stability of those products. Beside this lupine flour is used instead of wheat, rye or barley flour in the case of dietetic food. In France it is allowed to mix up to 10 % lupine flour to other flours without further declaration. Due to the fact that lupines can cause severe allergic reactions they should be declared in food products. 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** lupine must be declared on food labels.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to lupine proteins. By adding standards and samples to the wells, lupine 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 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 lupine 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 lupine proteins concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg lupine protein.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
Allergen Extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	1 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	3 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	9 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	27 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*) The **dilution factor 20** for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the lupine protein concentrations 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
- shaker

- water bath
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- variable 20 - 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 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 (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). **Do not freeze any of the 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 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for standard 5

9. Preparation of Samples

Lupine residues of previous analyses have to be removed completely! Therefore, samples should be prepared in new or very well cleaned glass vials.

Tools such as mincers have to be cleaned thoroughly after use, in order to avoid spreading traces of lupine or contaminations.

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.

- 5 g of the sample should be ground well and thoroughly mixed
- weigh 1 g of sample and add 20 ml of diluted extraction buffer (the extraction buffer should already have been heated to approx. 60 °C (140 °F))
- mix intensively and extract for 10 min at 60 °C (140 °F) by shaking casually
- cool down (e.g. ice water), centrifuge for 10 min / 2500 g (alternatively: 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a micro-centrifuge) and/or filter
- decant the supernatant (cloudy samples should be filtered with fluted paper filter)
- use 100 µl of the supernatant or filtrate per well in the assay

Remark:

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

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

The **wash 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 wash buffer is stable at 20 - 25 °C (69 – 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 Microtiter 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 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 four more times.
4. Add 100 µl of the diluted 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 four more times.
6. Add 100 µl of the reddish 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[®]SOFT Win.net (Art. Nr. 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.

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.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450 \text{ nm}}$) > standard 5.

Please note:

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 20. The allergen protein concentration can be read directly from the standard curve (see 4. *) - the sample dilution factor of 20 is already taken into account). Sample dilutions of more than 1:20 must be considered for the calculation of the allergen concentration.

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 the recovery can be significantly reduced.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- to analyze each sample material ~~shoud~~ in duplicates
- to use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls

- in case of extremely acid or alkaline samples, the pH should be adjusted to a neutral pH
- due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded.
- to carry out spiking experiments for an accurate and correct procedure
- to perform SureFood[®] PCR for confirmation of the result
- For details using the ChemWell[®] or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

The product information folder with further information is available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

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

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