

RIDASCREEN[®] FAST Sesame

Art. No. R7202

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sesam

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of sesame

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 Sesame (Art. Nr. R7202) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sesam bzw. Sesamanteilen in Fertigsuppe, Schokoladedessert, Backmischung und Cracker.

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:	0,14 mg/kg (ppm) Sesam; zwischen 0,08 – 0,20 mg/kg (ppm) abhängig von der Matrix
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg (ppm) Sesam
Spezifität:	Der eingesetzte Antikörper reagiert spezifisch mit Sesamproteinen.

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

bioavid Lateral Flow Sesame (Art. Nr. BL609-10/-25)
SureFood® PCR ALLERGEN Sesame

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Sesame (Art. Nr. R7202) ist ein Sandwich-Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sesam bzw. Sesamanteilen (als Ingredienzien oder als Kontamination) in Fertigsuppe, Schokoladedessert, Backmischung und Cracker.

2. Allgemeines

Sesamsamen (*Sesamum indicum*) werden roh oder geröstet als Zutat in vielen Lebensmitteln verwendet.

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 muss Sesam als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. In Kanada und Australien gibt es eine vergleichbare Gesetzgebung.

Die Sesamsamen-Allergie wird verstärkt als Gesundheitsproblem erkannt, die Symptome reichen von allergischem Hautausschlag bis zu lebensgefährlichen Anaphylaxien. Bisher konnten sieben verschiedene Proteine als Allergene in Sesam identifiziert werden (Ses i 1-7). Die einzige effektive Maßnahme um sensibilisierte Patienten vor einer Allergie zu schützen ist die strikte Vermeidung von sesamhaltigen Nahrungsmitteln.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Sesamproteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Sesamprotein an die spezifischen Fängerantikörper und es kommt ein Antikörper-Antigen-Komplex zustande. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Das an den Antikörper gebundene Enzym 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 Sesam-Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Sesam 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
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	2,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	5,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	10,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	20,0 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	-	6 ml
Substrate/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 Probenvorbereitung ergibt. So können die Sesam-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
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator

- Messpipetten
- Filterpapier
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- wenn möglich Multikanal- und/oder Multistepper-Pipette

5.2. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Magermilchpulver (MMP, Lebensmittelqualität)

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.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits nicht 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 Expiry) 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 Sesamreste entfernen und Kontamination zu vermeiden.

Der **Allergen Extraktionspuffer** 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. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1 + 9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der 1:10 verdünnte Allergen Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20 - 25 °C.

Dem verdünnten Extraktionspuffer muss 5 g Magermilchpulver (MMP) auf 100 ml zugesetzt werden. Es sollte immer nur so viel MMP-Puffer hergestellt werden wie benötigt wird. Der MMP-Puffer sollte nur einmalig auf 60°C erwärmt und innerhalb von 24 Stunden verwendet werden.

9.1. Probenaufarbeitung

- 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen, davon 1 g einwiegen und mit 20 ml final verdünntem Allergen Extraktionspuffer mit MMP-Zusatz versetzen (der Extraktionspuffer sollte schon eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- bzw. bei flüssigen Proben 1 ml Probe mit 19 ml final verdünnten Allergen Extraktionspuffer mit MMP-Zusatz versetzen (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C inkubieren, anschließend abkühlen (z. B. im Eisbad)
- 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:

Weitere Verdünnungen sollten mit dem final verdünnten Allergen Extraktionspuffer mit MMP-Zusatz durchgeführt werden.

Die Probenextrakte sind bei 4 °C etwa einen Tag haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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 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 in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Duplikate 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 zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl Konjugat zu allen Kavitäten geben, 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 Labor-

tüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem 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 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“ 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 Sesam-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 Matrizes sind im aktuellen Validierungsbericht beschrieben.

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

Empfehlungen:

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[®] durchzuführen
- bei der Analyse mittels Automaten (z. B. Thunder Bolt[®] / Bolt) sich an info@r-biopharm.de zu wenden.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen 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 Sesame

Brief information

RIDASCREEN[®] FAST Sesame (Art. No. R7202) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sesame or parts of sesame in instant soup, chocolate dessert, bakery products and crackers.

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: 0.14 mg/kg (ppm) Sesame; between 0.08 – 0.20 mg/kg (ppm) depending on the matrix

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) Sesame

Specificity: The antibody specifically detects proteins from sesame.

Cross reactivities of the used antibodies 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. 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

bioavid Lateral Flow Sesame (Art. No. BL609-10/-25)

SureFood® PCR ALLERGEN ID Sesame

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Sesame (Art. No. R7202) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sesame or parts of sesame (as ingredient components or contamination) in instant soup, chocolate dessert, bakery products and crackers.

2. General

Sesame seeds (*Sesamum indicum*) are used as raw or roasted ingredients in many different foods.

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, Sesam and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in Canada and Australia.

Sesame seed food allergy is an increasingly recognized health burden, the symptoms vary from allergic eczema to life threatening anaphylactic reactions. Until now, seven different proteins of sesame were identified as allergens (Ses i 1-7). The only effective treatment to protect sensitized patients from allergic symptoms is a strict avoidance of sesame containing food.

3. Test principle

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

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
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	2.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	5.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	10.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	20.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	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 20 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the sesame concentrations of samples can directly be read from the standard curve.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment

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

5.2. Reagents

- distilled or deionized water
- skim milk powder (SMP, food quality)

6. Warnings and precautions

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 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 expiry 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 sesame 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 (e.g. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted Allergen Extraction buffer is stable at 20 – 25 °C (68 -77 °F) for approx. 4 weeks.

Add 5 g skim milk powder (SMP) per 100 ml diluted Allergen Extraction buffer. Prepare only the quantity of SMP-buffer that is actually needed. The SMP-buffer

should only be heated once to 60°C (140 °F) and it should be used within 24 hours.

9.1. Sample preparation

- grind 5 g of the sample carefully and mix thoroughly
- weigh 1 g of the sample and add 20 ml final diluted Allergen Extraction buffer containing SMP (the extraction buffer should already have a temperature of approx. 60 °C (140 °F))
- or add 19 ml of the final diluted Allergen Extraction buffer containing SMP 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 (e.g. in an ice bath)
- 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

Further dilutions should be prepared with the finally diluted Allergen Extraction buffer with SMP.

The sample extracts can be stored at 4 °C (39 °F) for 1 day.

10. Test implementation

10.1. Test Preparation

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 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 (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 standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared 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 in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells.
4. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1). Repeat two more times.
5. Add 100 µl of 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).
6. 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.
7. Add 100 µl 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.
8. 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 RIDASOFT® 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. 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 sesame 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 analyzed matrices are described in the updated validation report.

The protein content and the protein composition may vary considerably between different sesame 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[®] PCR to confirm results

– Contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt[®] / Bolt) are used

Further product information and application notes, please contact 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

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