

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> $\beta$ -Lactoglobulin**

**Art. No.: R4901**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
 $\beta$ -Lactoglobulin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of  
 $\beta$ -lactoglobulin

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

Tel./Phone: +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<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin (Art. Nr. R4901) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  $\beta$ -Lactoglobulin in hydrolysierten Milchprodukten, einschließlich hypoallergener Babynahrung.

Für den Nachweis von nativem und prozessiertem  $\beta$ -Lactoglobulin in molke-, milch- oder milchpulverhaltigen Getränken, sowie in Saft, Wein, Bier und in Lebensmitteln wie Wurst, Dressings, Backwaren, Eis, Schokolade, Joghurt etc. wird empfohlen, den RIDASCREEN®FAST  $\beta$ -Lactoglobulin-Test (Art. Nr. R4902) anzuwenden.

Für den Nachweis von Casein oder Caseinaten in Lebensmitteln wird der RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612) empfohlen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren und extrahieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)..... ca. 30 min  
Testdurchführung (Inkubationszeit).....2 h 45 min

Nachweisgrenze: 2,1 mg/kg  $\beta$ -Lactoglobulin

Bestimmungsgrenze: 5 mg/kg  $\beta$ -Lactoglobulin

Spezifität: wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen ermittelt

$\beta$ -Lactoglobulin .....	100 %
$\alpha$ -, $\beta$ -, $\kappa$ -Casein .....	< 1 %
$\alpha$ -Lactalbumin .....	< 1 %
Rinderserumalbumin.....	< 1 %

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](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## **Produktangebot**

RIDASCREEN® FAST Milk (Art. Nr. R4652)

RIDASCREEN® FAST Casein (Art. Nr. R4612)

RIDASCREEN® FAST  $\beta$ -Lactoglobulin (Art. Nr. R4902)

RIDA® Extractor 2 (Art. Nr. R4613)

Bioavid Lateral Flow Milch/Milk (Art. Nr. BL613-10 / BL613-25)

## **1. Verwendungszweck**

RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  $\beta$ -Lactoglobulin in hydrolysierten Milchprodukten, einschließlich hypoallergener Babynahrung.

Der Test ist kalibriert auf hydrolysierte  $\beta$ -Lactoglobulin Kontrollproben; die Standards bestehen aus nativem  $\beta$ -Lactoglobulin. Der Test detektiert native und prozessierte Proteine und deren Fragmente (während des Erhitzens von Milch wird natives  $\beta$ -Lactoglobulin teilweise denaturiert).

## **2. Allgemeines**

Kuhmilch enthält ca. 3,2 % Protein (2,6 % Caseine und 0,6 % Molkeproteine). Ungefähr die Hälfte der Molkeproteine besteht aus  $\beta$ -Lactoglobulin.

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

Gemäß der EU RICHTLINIE 2006/141/EG DER KOMMISSION über Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung darf die Menge der Immunreaktionen hervorrufenden Proteine höchstens 1 % ausmachen.

### 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit  $\beta$ -Lactoglobulin (BLG) beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Proben und anti-BLG-Antikörper. Freies und immobilisiertes BLG konkurrieren um die BLG-Antikörper-Bindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nach einem Waschschrift werden Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Konjugat) zugegeben, die an die gebundenen anti-BLG-Antikörper binden. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Das an die Antikörper gebundene Konjugat wandelt das farblose 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 zu der  $\beta$ -Lactoglobulin-Konzentration in der Probe.

### 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen).

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Standard 1</b> Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 ng/ml	1,3 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	10 ng/ml	1,3 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	30 ng/ml	1,3 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	90 ng/ml	1,3 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	270 ng/ml	1,3 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	transparent	gebrauchsfertig	810 ng/ml	1,3 ml
<b>Wash buffer</b> Waschpuffer	braun	<b>Konzentrat</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	gebrauchsfertig		12 ml
<b>Antibody</b> Antikörper	weiß	<b>Konzentrat</b>	<b>11x</b>	0,7 ml
<b>Substrate</b> Substrat	grün	gebrauchsfertig		7 ml
<b>Chromogen</b> Chromogen	blau	gebrauchsfertig		7 ml
<b>Stop Solution</b> Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

## 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](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 farblose 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

- eine Blaufärbung des farblosen Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,8$ ) für Standard 1

## 9. Probenvorbereitung

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

Der **Waschpuffer** für Proben- und Antikörperverdünnung sowie Waschen liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor Gebrauch das Pufferkonzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Puffer ist bei 20 - 25 °C ca. vier Wochen haltbar.

- 2 g einer Probe in einem Zentrifugenglas abwiegen
- mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen und das Reagenzröhrchen ca. 10 min Kopf über bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) drehen
- den Extrakt 1:20 (1+19) mit verdünntem Probenverdünnungspuffer (siehe oben.) verdünnen (z. B. 50 µl Probe + 950 µl Puffer); die finale Verdünnung ist somit 1:500
- je 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 1 Tag haltbar.

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Antikörper** liegt als Konzentrat vor (Flasche mit weißem Verschluss). Da die rekonstituierte Lösung nur eine begrenzte Haltbarkeit aufweist, sollte immer nur soviel Antikörper mit Puffer verdünnt werden, wie unmittelbar benötigt wird. Den Antikörper sorgfältig mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss der Antikörper 1:11 (1+10) mit verdünntem Puffer (s.o.) verdünnt werden (z. B. 200 µl Antikörper + 2 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

## 10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden. Es wird empfohlen den Antikörper, 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 in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standardlösung bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl der verdünnten anti-β-Lactoglobulin-Antikörperlösung in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 2 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. 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.
5. Danach je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
6. 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.
7. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. Je 100 µl Stopp-Reagenz 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 / 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.

Die  $\beta$ -Lactoglobulin-Konzentration in ng/ml (ppb) wird aus der Standardkurve abgelesen. Die Konzentration muss noch mit dem Verdünnungsfaktor 500 multipliziert werden und in mg/kg (ppm) umgerechnet werden.

### **Rechenbeispiel:**

Aus der Standardkurve werden 150 ng/ml  $\beta$ -Lactoglobulin abgelesen. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 500, erhält man 75000 ng/g (entspricht 75 mg/kg)  $\beta$ -Lactoglobulin.

### **Generell:**

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

Natives, intaktes  $\beta$ -Lactoglobulin wird im Testkit unterbestimmt im Vergleich zu hydrolisiertem  $\beta$ -Lactoglobulin (in hydrolisierten Lebensmitteln sind mehr Epitope zugänglich für die Antikörperbindung).

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

### **Empfehlung:**

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, empfehlen wir:

- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- Bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.

- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Spike Versuche durchzuführen (weitere Informationen siehe Validierungsbericht)
- Proben mit Extinktionen < Standard 6 weiter verdünnen und nochmals analysieren (Bei der Auswertung den zusätzlichen Verdünnungsfaktor beachten!)

Für weitere Produktinformationen kontaktieren Sie bitte [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de).

### **Weitere Applikationen:**

- Analysis of gluten or  $\beta$ -Lactoglobulin in supplemental enzymes

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<sup>®</sup> $\beta$ -Lactoglobulin

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup>  $\beta$ -Lactoglobulin (Art. No. R4901) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  $\beta$ -lactoglobulin in hydrolyzed milk products including hypoallergenic baby food.

For the detection of native and processed  $\beta$ -lactoglobulin in beverages containing whey, milk or milk powder as well as in juice, wine, beer and in food like sausages, dressings, bakery products, ice, chocolate, yoghurt, etc. the use of RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST  $\beta$ -Lactoglobulin (Art. No. R4902) is recommended.

To detect casein or caseinates in food, the use of RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST Casein (Art. No. R4612) is recommended.

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

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for analysis.

Sample preparation: homogenization and extraction

Time requirement: sample preparation (for 10 samples) .....approx. 30 min  
test implementation (incubation time) .....2 h 45 min

Limit of detection: 2.1 mg/kg  $\beta$ -lactoglobulin

Limit of quantification: 5 mg/kg  $\beta$ -lactoglobulin

Specificity: was determined by analyzing the cross reactivities to corresponding substances

$\beta$ -Lactoglobulin .....	100 %
$\alpha$ -, $\beta$ -, $\kappa$ -Casein.....	< 1 %
$\alpha$ -Lactalbumin.....	< 1 %
bovine serum albumin .....	< 1 %

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](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

### **Related products**

RIDASCREEN® FAST Milk (Art. No. R4652)

RIDASCREEN® FAST Casein (Art. No. R4612)

RIDASCREEN® FAST  $\beta$ -Lactoglobulin (Art. No. R4902)

RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

Bioavid Lateral Flow Milch/Milk (Art. No. BL613-10 / BL613-25)

### **1. Intended use**

RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  $\beta$ -lactoglobulin in hydrolyzed milk products including hypoallergenic baby food. The assay is calibrated to hydrolyzed  $\beta$ -lactoglobulin check samples; the standards consist of native  $\beta$ -lactoglobulin. The assay detects native and processed protein and fragments thereof (during the heating of milk, the native  $\beta$ -lactoglobulin is partially denatured).

### **2. General**

Cow's milk contains approx. 3.2 % proteins (2.6 % caseins and 0.6 % whey proteins). Approx. half of the whey fraction consists of  $\beta$ -lactoglobulin.

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

According to the Commission Directive 2006/141/EC on infant formulae, the immunoreactive protein shall be less than 1 %.

### 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with  $\beta$ -lactoglobulin (BLG). Standards, respectively sample solutions and anti-BLG antibodies are added. Free and immobilized BLG compete for the antibody binding sites. After washing, secondary antibodies labeled with peroxidase (enzyme conjugate) are added. These bind to the antibody-BLG-complexes. Any unbound conjugate is then removed by a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. Addition of the stop solution causes a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the  $\beta$ -lactoglobulin concentration in the sample.

### 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses).

Component	Cap color	Format		Volume
<b>Microtiter plate</b>	-	Ready to use		96 wells
<b>Standard 1</b>	Transparent	Ready to use	0 ng/ml	1.3 ml
<b>Standard 2</b>	Transparent	Ready to use	10 ng/ml	1.3 ml
<b>Standard 3</b>	Transparent	Ready to use	30 ng/ml	1.3 ml
<b>Standard 4</b>	Transparent	Ready to use	90 ng/ml	1.3 ml
<b>Standard 5</b>	Transparent	Ready to use	270 ng/ml	1.3 ml
<b>Standard 6</b>	Transparent	Ready to use	810 ng/ml	1.3 ml
<b>Wash buffer</b>	Brown	<b>Concentrate</b>	<b>10x</b>	100 ml
<b>Conjugate</b>	Red	Ready to use		12 ml
<b>Antibody</b>	White	<b>Concentrate</b>	<b>11x</b>	0.7 ml
<b>Substrate</b>	Green	Ready to use		7 ml
<b>Chromogen</b>	Blue	Ready to use		7 ml
<b>Stop solution</b>	Yellow	Ready to use		14 ml

### 5. Reagents required but not provided

#### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal vials

- shaker
- water bath
- laboratory mincer/grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- 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](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 colorless 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 colorless chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.8$ ) for standard 1

## 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 milk and to avoid contamination.

The **wash buffer** for sample dilution, antibody dilution and washing is provided as a 10fold concentrate. Before use the buffer concentrate has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted buffer expires after approx. four weeks at 20 – 25 °C (68 - 77 °F).

- weigh 2 g of a sample in a centrifugal vial
- add distilled water up to a final volume of 50 ml and rotate the vial for 10 min (head over end) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute the extract 1:20 (1+19) with diluted buffer (e.g. 50 µl sample + 950 µl buffer); the final dilution therefore is 1:500
- use 50 µl per well in the assay

**The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °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 **antibody** (bottle with white cap) is provided as a concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the antibody solution should be shaken carefully. For reconstitution, the antibody concentrate is diluted 1:11 (1+10) in diluted buffer (see above), e. g. 200 µl concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips.

### 10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps. It is recommended to pipette the antibody, 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 in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of each standard solution or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the diluted antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 2 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete

- removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 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 diluted washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
  7. Add 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 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 RIDA<sup>®</sup>SOFT Win / 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 β-lactoglobulin concentration in ng/ml (ppb) corresponding to the absorbance of each sample is read from the calibration curve. This concentration must be further multiplied by the dilution factor 500, the concentration of β-lactoglobulin actually contained in a sample is then converted into mg/kg (ppm).

### **Calculation example:**

150 ng/ml β-lactoglobulin is read from the calibration curve. After multiplication with the dilution factor 500 the resulting concentration is 75000 ng/g (75 mg/kg) β-Lactoglobulin.

### **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 casein or lactose 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.

Native, intact  $\beta$ -lactoglobulin is underestimated in the test kit compared to hydrolyzed  $\beta$ -lactoglobulin (in hydrolyzed products more accessible epitopes are available for antibody binding).

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

### **Recommendation:**

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- to analyze each sample material 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 (for more information refer to the validation report)
- further dilute samples with absorbances < standard 6 and analyze again (note the additional dilution factor for calculation!)

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

### **Further application notes:**

- Analysis of gluten or  $\beta$ -lactoglobulin in supplemental enzymes

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