RIDASCREEN®FAST Soya

REF R7102

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Sojaproteinen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of soya protein

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C (36 - 47 °F)

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20

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

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

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

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

Order department
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-mail: orders@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 Soya (Art. Nr. R7102) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sojaproteinen in für die Methode validierten Lebensmitteln (siehe Kapitel 1).

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

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ..... ca. 25 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min
Standardmaterial:	Sojaprotein (Sojamehl mit 39 % Sojaprotein).
Nachweisgrenze:	0,24 mg/kg (ppm) Sojaprotein* Matrix-abhängig 0,15 – 0,32 mg/kg (ppm) *Mittelwert
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg Sojaprotein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit erhitzten Sojaproteinen. (Die Probenextraktion bei **100 °C für 10 min** stellt sicher, dass alle Sojaproteine denaturieren und im ELISA erfasst werden). Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Leguminosen der Tribus *Phaseoleae* (z. B. Bohnen), der Gattung *Vicia* (z. B. Ackerbohne), zu getrockneten Erbsen bzw. Erbsenmehl und zu Erdnuss. Weitere Informationen können dem Validierungsbericht entnommen werden.

Die Kreuzreaktivitäten der in diesem Test eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z. B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z. B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potenziell interferierende Substanzen (z. B. Polyphenole) können durch Dotierversuche erkannt werden (siehe Kapitel 13 und 14).

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch „Gute ELISA Praxis“. 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 https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/ abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere Produkte für den Nachweis von Soja

RIDA®QUICK Soya (Art. Nr. R7103)
bioavid Lateral Flow Soy incl. Hook Line (Art. Nr. BLH712-15)
SureFood® ALLERGEN ID 4plex Soya/Celery/Mustard + IAC (Art. Nr. S3401)
SureFood® ALLERGEN Soya (Art. Nr. S3601)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Soya (Art. Nr. R7102) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem Sojaprotein in Lebensmitteln. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Lebensmittel wurden folgende Proben stellvertretend für verschiedene Warengruppen im Rahmen der Testentwicklung untersucht: Wurst, Dressings, Backwaren, Eis, Schokolade, Suppen, Saucen, Margarine usw.

Generell sollte das Testkit innerhalb der methodischen Grenzen (siehe Kapitel 13) auch für die Analyse weiterer Lebensmittel verwendbare Ergebnisse liefern.

Detaillierte Ergebnisse hierzu, sowie weitere Informationen zu Validierungsdaten mit anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem Validierungsbericht. Weitere Applikationen werden regelmäßig in unseren Laboratorien validiert, die wir in unseren Application Notes (siehe Kapitel 15.) zur Verfügung stellen.

2. Allgemeines

Sojaproteine können als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 muss Soja 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.

Sojabohnen (reife Samen, roh) bestehen zu etwa 35 % aus Proteinen. Häufig wird Soja als Ersatz für tierische Eiweiße verwendet (z. B. in Tofu, Sojamilch und Sojajoghurt). Daneben besitzen Sojabohnen mit etwa 20 % auch einen hohen Fettanteil, der zur Herstellung von Ölen und Fetten genutzt wird. Die Verwendung von Soja sowohl als Nahrungsmittel als auch als Futtermittel hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Soja-Proteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe binden in der Probe vorhandene Soja-Proteine an die spezifischen Fängerantikörper, was zu der Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes führt. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschritt entfernt. Danach erfolgt die Zugabe der Peroxidase-gekoppelten Antikörper-Lösung. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschritt entfernt. Eine Substrat/Chromogen-Lösung wird in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben. Das an das Antikörperkonjugat gebundene Enzym wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der Lösung, die proportional zur Sojaprotein-Konzentration in der Probe ist, wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Das Ergebnis wird in mg/kg Soja-Protein angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	Gebrauchsfertig		48 Kavitäten
4x Extractor 3 4x Extraktor 3	Braun	Gebrauchsfertig		30 ml
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	**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 100,** der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Sojaprotein-Konzentration der Probe direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1 Geräte

- Laborhandschuhe
- Waage (Messbereich mindestens bis zu 50 g, Genauigkeit von ± 0,01 g)
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Zentrifuge (mind. 2.500 x *g*) + zentrifugierbare Reagenzröhrchen mit Verschluss (z. B. 50 ml centrifuge tubes von Greiner Art. Nr. 227261)
- Schüttler
- Wasserbad (60 °C und 100 °C; die Schwankungsbreite entnehmen Sie der Anweisung des Wasserbad-Herstellers)
- Faltenfilter (Porengröße 8 - 12 µm)

- Messpipetten
- Messzylinder
- Variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Gegebenenfalls: Mikrotiterplatte (z. B. Universal Binding, breakable MTP von Thermo Fisher Scientific, Art. Nr. 95029390 oder low binding Greiner bio-one, Art. Nr. 655901)
- Gegebenenfalls: 8-Kanalpipette für 100 µl
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF)

5.2 Reagenzien

- Destilliertes (dest.) oder deionisiertes Wasser
- Gegebenenfalls (für die Aufarbeitung von tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln): Casein (z. B. Sigma C5890) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) K15 oder K17 (z. B. AppliChem A2258)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Produkt / der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet.

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.

Die Kavitäten der Mikrotiterstreifen (beschichtete Mikrotiterplatte aus dem Kit, sowie gegebenenfalls zusätzliche Mikrotiterplatte zum Vorpipettieren (siehe Kapitel 10.2) dürfen nicht wiederverwendet werden. Für jeden Standard und jedes Probenextrakt separate Pipettenspitzen verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Der Extraktor 3 enthält β-Mercaptoethanol. Es wird empfohlen, **unter einem Abzug** zu arbeiten. Hautkontakt ist zu vermeiden (Handschuhe tragen!).

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch unter Beachtung des Schutzes von Mensch und Umwelt eigenverantwortlich verwertet oder beseitigt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften (z. B. Kreislaufwirtschaftsgesetz, Gefahrenstoffverordnung, etc.).

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Für die Entnahme von Mikrotiterstreifen den Folienbeutel erst nach Erreichen der Raumtemperatur (20 - 25 °C) öffnen, um die Bildung von Kondenswasser in den Kavitäten zu vermeiden.

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.

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.
- Absorption kleiner 1,2 ($A_{450\ nm} < 1,2$) für Standard 5.

9. Probenvorbereitung

Vor Beginn und während der Durchführung der Probenextraktion und des Tests sind Laborhandschuhe zu tragen. Luftgetragene Allergene und unsaubere Laborausrüstung können zu einer Kontamination im Test führen. Daher wird empfohlen, die folgenden Vorkehrungen zu treffen:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung vor und nach jeder Probe gründlich reinigen.
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen.

Die Proben bis zur Aufarbeitung kühl und lichtgeschützt lagern.

Es wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten, da der Extraktor 3 ß-Mercaptoethanol enthält.

Der Allergen Extraktionspuffer (**AEP**) liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch verdünnt werden. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle

sind vor der Verdünnung durch Erwärmen (Wasserbad 37 °C) zu lösen. Anschließend das Konzentrat gut mischen. Das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 ml Konzentrat). Der verdünnte Allergen Extraktionspuffer (AEP) hat eine Haltbarkeit von ca. 4 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bzw. 12 Wochen bei 2 - 8 °C. Der pH-Wert der Proben sollte neutral sein.

Stellen Sie sicher, dass der AEP rechtzeitig im 60 °C Wasserbad erhitzt wird (das 100 °C Wasserbad wird für die Extraktion der Proben verwendet).

Für die Extraktion laut 9.2 (tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel), muss der verdünnte AEP mit 0,25 % Casein und 1 % PVP versetzt werden (= **Casein-PVP-AEP**) (z. B. 20 ml verdünnter AEP + 0,05 g Casein + 0,2 g PVP). Die Komponenten lösen sich besser, wenn der AEP auf 60 °C vorgewärmt wurde. Der verdünnte Casein-PVP-AEP ist bei 2 - 8 °C ca. 7 Tage haltbar.

In den folgenden Kapiteln werden für die unterschiedlich verwendeten Puffer folgende Abkürzungen verwendet:

- AEP: final verdünnter Allergen Extraktionspuffer
- Casein-PVP-AEP: AEP mit Zusatz von Casein und PVP

9.1 Extraktion mit AEP (**ohne** Verwendung von Casein und PVP)

Den AEP vor der Probenextraktion in einem Wasserbad auf 60 °C vorwärmen.

Eine repräsentative, ausreichend große Menge einer festen Probe homogenisieren (z. B. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe gut mischen.

- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen und mit 2,5 ml Extraktor 3 sowie 17,5 ml (bzw. 16,5 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten und final verdünnten AEP (siehe Kapitel 9) versetzten.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Anschließend 10 min bei 100 °C (Wasserbad) extrahieren (das gesamte Probenröhrchen sollte von kochendem Wasser bedeckt sein).
- Probe kurz abkühlen lassen (z. B. 3 - 5 min im Eisbad).
- Probe zentrifugieren: 10 min bei mind. 2.500 x *g* (wenn möglich bei 4 °C) und/oder filtrieren.
  Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x *g* zentrifugieren.
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Die Extrakte müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit AEP verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2).

Anmerkung

Der partikelfreie Extrakt (Überstand nach Zentrifugation bzw. Filtration) kann in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C ca. 3 Tage aufbewahrt werden. Nicht verwendete Extrakte können darüber hinaus unverdünnt einige Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.

9.2 Extraktion von tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln wie Gewürze, Schokolade, Kaffee (mit Verwendung von Casein und PVP)

Den Casein-PVP-AEP vor der Probenextraktion in einem Wasserbad auf 60 °C vorwärmen.

Eine repräsentative, ausreichend große Menge einer festen Probe homogenisieren (z. B. 50 g sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen). Im Falle von flüssigen Lebensmitteln die Probe gut mischen.

- 1 g (bzw. im Falle von flüssigen Proben 1 ml) der homogenisierten Probe in ein frisches Gefäß überführen und mit 2,5 ml Extraktor 3 sowie 17,5 ml (bzw. 16,5 ml im Falle von flüssigen Proben) vorgewärmten Casein-PVP-AEP (siehe Kapitel 9) versetzten.
- Gründlich mischen (z. B. Vortexer).
- Anschließend 10 min bei 100 °C (Wasserbad) extrahieren (das gesamte Probenröhrchen sollte von kochendem Wasser bedeckt sein).
- Probe kurz abkühlen lassen (z. B. 3 - 5 min im Eisbad).
- Probe für 10 min bei mind. 2.500 x *g* (wenn möglich bei 4 °C) zentrifugieren und/oder filtrieren.
  Alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig > 10.000 x *g* zentrifugieren.
- Überstand vom Pellet abnehmen und in ein neues Gefäß überführen.
- Sollte nach der Zentrifugation kein partikelfreier Überstand vorliegen, sind die Extrakte zusätzlich zu filtrieren.
- Die Extrakte müssen vor der Verwendung im Test grundsätzlich mit AEP verdünnt werden (siehe Kapitel 10.2).

Anmerkung

Der partikelfreie Extrakt (Überstand nach Zentrifugation bzw. Filtration) kann in einem gut verschlossenen Gefäß bei 2 - 8 °C ca. 3 Tage aufbewahrt werden. Nicht verwendete Extrakte können darüber hinaus unverdünnt einige Monate bei -20 °C aufbewahrt werden.

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 900 ml dest. Wasser + 100 ml

Pufferkonzentrat). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei 2 - 8 °C.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2 Testdurchführung

Die hergestellten Extrakte laut Kapitel 9.1 und 9.2 müssen vor dem Einsatz im Test 1:5 (1+4) mit verdünntem AEP (siehe Kapitel 9) verdünnt werden (z. B. 400 µl AEP + 100 µl Probe).

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite, unbeschichtete Platte (siehe Kapitel 5.1) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte durch das Pipettieren zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität). Hiervon werden dann genau 100 µl zügig mit einer 8-Kanalpipette auf die beschichtete Platte transferiert.

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

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und die Mikrotiterplatte abdecken.

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 nach Kapitel 9 vorbereiteten und nach 10.2 verdünnten Probenextrakte als Doppelbestimmung 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. Alle Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).

4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (siehe Kapitel 10.1) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren 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 verdünntem Waschpuffer (siehe Kapitel 10.1) befüllen und anschließend wie zuvor entleeren. Diesen Vorgang weitere zweimal wiederholen (insgesamt drei Waschzyklen).
6. Je 100 µl rot gefärbtes Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren 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 optional eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. Nr. Z9996FF),** erhältlich. Die Auswertung sollte mittels Cubic spline-Funktion erfolgen.

Höhere Absorptionswerte (A_{450nm}) der Standardkurve im Vergleich zu den Daten laut Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Soja-Kontamination der Reagenzien hinweisen.

Proben mit Absorptionswerten (A_{450nm}), die größer Standard 5 sind, sollten zur exakten Bestimmung der Kontamination zusätzlich verdünnt und nochmals bestimmt werden. Bei einer weiteren Verdünnung muss der zusätzliche Verdünnungsfaktor bei der Berechnung des Ergebnisses berücksichtigt werden. Weitere Verdünnungen sollten mit dem Allergen Extraktionspuffer (AEP) durchgeführt werden.

Es ist abzuklären, dass für den aktuellen Testlauf alle Qualitätskriterien erfüllt sind. Der Verlauf der Standardkurve kann dem Qualitätssicherheitszertifikat (Analysenzertifikat, CoA) entnommen werden, das über den QR-Code auf dem Testkit-Außenetikett erhältlich ist. Da die Absorptionswerte im Labor von den auf dem Zertifikat genannten abweichen können, wird empfohlen, die Verhältnisse der Standards zueinander mit denen auf dem Zertifikat zu vergleichen. Hierfür werden die B/B_{max}-Werte (das Verhältnis der Absorptionswerte der Standards zum höchsten Standard) miteinander

verglichen. Diese sollten im aktuellen Testlauf ähnlich zu den Verhältnissen der Standards auf dem Zertifikat sein.

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 100. Die Allergen-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden, da der Probenverdünnungsfaktor 100 bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 4*).

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:100 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Sojaprotein-Konzentration berücksichtigt werden. Wenn z.B. auf 1 % Sojamehl (entspricht 10.000 mg/kg Sojamehl bzw. ca. 3.900 mg/kg Sojaprotein) untersucht wird, dann muss die Probe 1:70.000 verdünnt werden (1:100 gemäß Probenaufarbeitung und zusätzlich 1:700 mit Allergen Extraktionspuffer).

Der Test kann auch im Falle der Durchführung von Einzelbestimmungen ausgewertet werden. Dies hat keinen Einfluss auf die Funktion des Testkits. In der RIDASOFT® Win.NET Software muss allerdings hierfür eine eigene Auswertung erstellt werden. Die Auswertung von Einzelbestimmungen ist standardmäßig nicht vorhanden. Jedes Labor kann für sich nach einer qualifizierten Risiko-Management-Analyse entscheiden, den Test in Einzelbestimmung durchzuführen. Es ist aber zu beachten, dass dies nicht dem Vorgehen entspricht, das in Standards wie EN 15633-1 und EN 15842 gefordert wird. Das Risiko, Fehler in der Durchführung des Tests (z. B. Pipettierfehler) zu übersehen, ist in diesem Fall erhöht. Außerdem ist eine höhere Schwankung der Ergebnisse bei Einzelbestimmungen zu erwarten.

12. Interpretation der Ergebnisse

Ergebnisse zwischen LoD und LoQ können auf einen geringen Gehalt des untersuchten Analyten in der Probe hinweisen. Je nach untersuchter Matrix können auch unterhalb des LoQ noch Werte mit ausreichender Präzision (VK < 30 %) ermittelt werden. Grundsätzlich sind Werte in diesem Bereich aber aufgrund der höheren Schwankungsbreite des Tests mit einer größeren Unsicherheit versehen. Sofern die Präzision des Tests mit einer bestimmten Probenmatrix nicht validiert wurde, sollten Ergebnisse unterhalb des Messbereichs deshalb nicht quantitativ als Wert, sondern qualitativ “< LoQ“ angegeben werden. Weitere Informationen hierzu können Sie dem aktuellen Validierungsbericht entnehmen.

Ein Ergebnis unterhalb der LoD schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt, oder dass andere Allergenkomponenten, wie z. B. Lipide, in einer Probe

enthalten sein können. Die Interpretation des Ergebnisses sollte entsprechend formuliert werden.

13. Grenzen der Methode

Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Matrix, der Testdurchführung und den Laborbedingungen schwanken.

Nachweis- und Bestimmungrenzen sind abhängig von der jeweiligen Probenmatrix, dem Grad der Prozessierung und dem Extraktionsverfahren.

Der Proteinanteil und die Proteinzusammensetzung können in verschiedenen Sojasorten unterschiedlich sein. Verschiedene Sojasorten können daher unterschiedliche Ergebnisse liefern, da die Kalibrierung des Tests gegen das exemplarische, im Standardmaterial verwendete Sojamehl vorgenommen wurde.

Außerhalb des angegebenen Messbereichs werden die technischen Grenzen der Testmethode erreicht, was sich durch größere Schwankungen der Ergebnisse im Falle von Wiederholungsuntersuchungen bemerkbar macht. Hierdurch können besonders Proben, die an den charakteristischen Grenzen der Methode (LoD, LoQ, obere Grenze des Messbereichs) liegen, zwischen den Bereichen der Kalibrationskurve wechseln.

Eine falsche Einwaage der zu untersuchenden Probe hat Einfluss auf das Messergebnis (z. B. wird bei einer Einwaage von +10 % eine um 10 % höhere Konzentration gemessen). Zuverlässige Messergebnisse sind in der Regel bei einer Abweichung der Einwaage bis maximal ±1 % gegeben.

Für den vorliegenden ELISA konnten aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln nur einzelne, exemplarische Lebensmittel aus unterschiedlichen Produktgruppen validiert werden. Bei der Analyse einer nicht validierten Matrix wird die Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse mittels Dotierexperimenten empfohlen. Gegebenenfalls ist eine Validierung der zu untersuchenden Matrix vorzunehmen.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. Diese können zu falsch-positiven oder erhöhten Ergebnissen führen, aber auch eine korrekte Reaktion verringern bzw. unterdrücken. Solche Matrixeffekte sind unabhängig von der Spezifität des im Test verwendeten Antikörpers und können durch Dotierversuche sichtbar gemacht werden. Für detaillierte Informationen zu potentiellen Matrixeffekten einzelner Lebensmittel schauen Sie bitte in den Validierungsbericht.

In prozessierten (z. B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und / oder fragmentiert werden. Dies kann die Wiederfindung und Testergebnisse 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.

Kreuzreaktivitäten sind Nebenreaktionen des im Test verwendeten Antikörpers mit Antigenen, die ähnliche Epitope wie der gesuchte Analyt aufweisen. Diese treten besonders bei Antigenen aus nahe verwandten Spezies auf. Es handelt sich im Gegensatz zu Matrixeffekten um eine spezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen. Die antigenen Strukturen unterliegen ähnlichen Einflüssen (z. B. durch Erhitzung, Trocknung, etc.) wie der eigentliche Analyt. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktivitäten durch die Prozessierung von Lebensmitteln verloren gehen oder auch erst in Erscheinung treten.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Lebensmittel wurde jeweils eine repräsentative Probe verwendet. Andere Proben der gleichen Lebensmittel können abweichende Ergebnisse liefern. Alle analysierten Kreuzreaktivitäten sind im Validierungsbericht beschrieben.

Detaillierte Ergebnisse sowie weitere Informationen zu anderen Lebensmittelmatrizes entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht. Darüber hinaus können zu einzelnen Lebensmitteln Daten aus Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuchen vorliegen.

14. Empfehlung

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, wird außerdem empfohlen:

- Die allgemeinen Qualitätssicherungsanforderungen für Laboratorien, wie sie in den Normen EN 15633-1 und 15842 aufgeführt werden (z. B. Durchführung von Doppelbestimmungen) zu befolgen.
- Pipettenspitzen vor dem Pipettieren jeweils mit Standard oder Probenextrakt vorzuspülen.
- Mitnahme von Testkontrollen zur Qualitätskontrolle. Hierfür sind Allergen-freie und Allergen-haltige (dotierte) Proben zu verwenden.
- Bei extrem sauren oder basischen Proben den pH-Wert der Probe vor der Extraktion auf neutral (pH 6,5 bis 7,5) einzustellen.
- Zur Bestätigung der Ergebnisse eine PCR (z. B. SureFood®) durchzuführen.

- Für die Analyse mittels Automaten (z. B. ThunderBolt®, GEMINI oder ChemWell®) info@rbiopharm.de kontaktieren.

15. Weitere Applikationen

- Probenaufarbeitung für Caseinate (“Analysis of Caseinates and Casein hydrolysates”)
- Wischtest-Anwendung für ELISA Allergene („Allergen swabbing using RIDASCREEN® allergen ELISAs“)

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

Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2016-07-18	Vorgängerversion
2025-10-01	Aktuelle Version Vorgenommene Änderungen: - Generelle sprachliche und formelle Überarbeitung - Entfernung Verweis auf „Set of 3 processed Soya Assay Controls“ (Art. Nr. R7132); Produkt wurde eingestellt - Aktualisierung der Liste der weiteren Produkte für den Nachweis von Soja - Vervollständigung Kapitel 5 - Änderung der Entsorgungsklausel im Kapitel 6 - Änderungen Kapitel 9: • Vorbereitung benötigter Puffer für tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel verschoben von Kapitel 9.3 nach Kapitel 9 • Zusammenführung Probenaufarbeitung 9.1 und 9.2 (jetzt 9.1) • Verschiebung nötiger Verdünnung für Einsatz im Test von Kapitel 9.1, 9.2 bzw. 9.3 nach Kapitel 10.2 - Erstellung und Ausarbeitung der Kapitel 11, 12, 13 und 14 - Erstellung Versionsübersicht - Aktualisierter Haftungsausschluss

Symbolerklärung

Allgemeine Symbole:

Gebrauchsanweisung beachten

Chargennummer

Verfallsdatum (YYYY-MM-DD)

Lagertemperatur

Artikelnummer

Anzahl Testbestimmungen

Herstelldatum (YYYY-MM-DD)

Hersteller + Adresse

Haftungsausschluss

1. R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.
2. Insbesondere erstreckt sich die Gewährleistung und die sich hieraus ergebende Haftung aufgrund Pflichtverletzung wegen Schlechtleistung nicht auf Folgen, die nicht nachweisbar auf fehlerhaftem Material, Konstruktion, Herstellerstoffen, Nutzungsleistungen, oder fehlerhafter Ausführung beruhen, und auch nicht auf die Folgen fehlerhafter Benutzung oder ungeeigneter Lagerung oder chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse, die von vereinbarten Produktspezifikationen, Produktbeschreibungen oder in dem jeweils produktspezifischen Datenblatt der R-Biopharm AG oder herstellerseits vorgesehenen durchschnittlichen Standardeinflüssen abweichen.
3. R-Biopharm AG übernimmt auch keine Gewährleistung für nicht von R-Biopharm AG vollzogenen Veränderungen, Bearbeitungen, Nutzungen oder Verarbeitungen, die nicht dem vertraglich vereinbarten Bestimmungszweck der Produkte entsprechen oder mit der allgemeinen Produktsicherheit vereinbar sind.
4. Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.
5. Ziff. 1-4 gelten nicht bei Arglist, grober Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG oder Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand oder soweit sonst gesetzlich eine längere Verjährungsfrist zwingend festgesetzt ist. § 305 b BGB (der Vorrang der Individualabrede in mündlicher oder textlicher oder schriftlicher Form) bleibt unberührt. Eine Umkehr der Beweislast ist mit der vorstehenden Regelung nicht verbunden.

RIDASCREEN®FAST Soya

Brief information

RIDASCREEN®FAST Soya (Art. No. R7102) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of soy proteins in foods validated for the method (see chapter 1).

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

Sample preparation:	homogenization and extraction
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)... approx. 25 min test implementation (incubation time)..... 30 min
Standard material:	Soy protein (soy flour with 39 % soy protein)
Limit of detection:	0.24 mg/kg (ppm) soy protein* 0.15 - 0.32 mg/kg (ppm) depending on the matrix *mean value
Limit of quantification:	2.5 mg/kg (ppm) soy protein
Specificity:	The antibodies specifically detect heated soy proteins. (The sample extraction at **100 °C (212 °F) for 10 min** ensures that all soy proteins denature and can be detected in the ELISA). There is a cross-reactivity to legumes of the tribe *Phaseoleae* (e.g. beans), the genus *Vicia* (e.g. fava bean), to dried peas / pea flour and to peanut. Further information is contained in the validation report.

Cross reactivities of the antibodies used for this test kit have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In composed / processed food (e.g. maize bread) cross reactivities might be different. Potentially interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments (see chapter 13 and 14).

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA procedures, we refer additionally to our “Good ELISA Practice” brochure. It lists minimum standards and conditions that are required when using test kits of R-Biopharm AG to perform ELISA analysis. The brochure can be retrieved, printed and downloaded from the website https://food.r-biopharm.com/media/technical-guides/.

Related product and accessories for soy determination

RIDA®QUICK Soya (Art. No. R7103)
bioavid Lateral Flow Soy incl. Hook Line (Art. No. BLH712-15)
SureFood® ALLERGEN ID 4plex Soya/Celery/Mustard + IAC (Art. No. S3401)
SureFood® ALLERGEN Soya (Art. No. S3601)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Soya (Art. No. R7102) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of native and processed soy protein in food. Due to the large number of different food products, the following samples were examined as representative for different food product categories within the scope of the test development: sausage, dressing, bakery products, ice, chocolate, soup, sauce, margarine etc.

The test kit should generally be able to provide usable results for other foods within the methodological limits (see chapter 13).

For detailed results and further information on validation data with other food matrices, please refer to the validation report. Further applications are regularly validated in our laboratories and made available in our application notes (see chapter 15).

2. General information

Soy proteins can be present as an ingredient or as a contamination in raw and processed products. According to the regulation (EU) No. 1169/2011, soy must be declared on food labels as it can induce allergic reactions. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Soybeans (mature seeds, raw) contain approx. 35 % proteins. Therefore, soy is one of the few plants which are considered as a valuable source of proteins. Thus, soy is widely used as substitute for proteins from animal sources (e.g. in tofu, soy milk or soy yoghurt). Besides the high protein content, soy beans are

also rich in fat (approx. 20 %) and are used for the productions of oils and fats. The usage of soy as food and feed has strongly increased in the last decades.

3. Test principle

The principle of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against soy proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, soy proteins present in the sample will bind to the specific capture antibodies resulting in the formation of an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. Following the washing step, a solution containing conjugated soy protein specific antibodies is added. This conjugate is bound to the Ab-Ag-complex and an antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in another washing step. A substrate/chromogen solution is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the chromogen into a blue end product. A stop solution is added which results in a color change from blue to yellow. The absorbance of the solution which is proportional to the soy protein concentration in the sample is measured photometrically at 450 nm. The result is expressed as mg/kg soy proteins.

4. Reagents provided

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
4x Extractor 3	Brown	Ready to use		30 mL
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	**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 concentration values of the standards already take into account the **dilution factor of 100** coming from sample extraction. Therefore, the soy protein concentration of samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1 Equipment

- Gloves
- Scale (measurement range at least up to 50 g and precision of ± 0.01 g)
- Laboratory mincer / grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- Centrifuge (at least 2,500 x *g*) + centrifugal vials with cap (e.g. 50 mL centrifuge tubes from Greiner Art. No. 227261)
- Shaker
- Water bath (60 °C (140 °F) and 100 °C (212 °F); for fluctuation range please refer to the instructions of the water bath manufacturer)
- Fluted filter (pore size 8 - 12 µm)
- Graduated pipettes
- Measuring cylinder
- Variable 20 - 200 µL and 200 - 1000 µL micropipettes

- If necessary: a further microtiter plate (e.g. universal binding, breakable MTP from Thermo Fisher Scientific Art. No. 95029390 or low binding Greiner bio-one Art. No. 655901)
- If necessary: 8-channel pipette for 100 µL
- Microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- Optional: RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)

5.2 Reagents

- Distilled water (dist. water) or deionized water
- If necessary (for the sample preparation of tannin and polyphenol containing food): casein (e.g. Sigma C5890) and polyvinylpyrrolidon (PVP) K15 or K17 (e.g. AppliChem A2258)

6. Warnings and precautions for the users

The product / test is only suitable within the scope of its intended use.

This test should only be carried out by trained laboratory personnel. 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.de.

Do not reuse wells of the microtiter strips (coated microtiter plate and pre-plate if necessary, see chapter 10.2). Use separate pipette tips for each standard and each sample extract to avoid cross contamination.

Extractor 3 contains β-mercaptoethanol. It is recommended to work **under a fume hood**. Avoid skin contact (wear gloves!).

All reagents and materials must be recovered or disposed after use at customers own responsibility according to the protection of human health and the environment. Please observe the applicable national regulations concerning waste disposal (e.g. Waste Management Act, Regulations on Dangerous Chemicals, etc.).

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components. Consider also the following advice for the extraction tablets.

To avoid moisture inside the wells, open the foil bag for withdrawal of microwells only after having reached room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

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).

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Bluish coloration of the reddish substrate/chromogen prior to test implementation.
- Value of less than 1.2 absorbance units ($A_{450\ nm} < 1.2$) for standard 5.

9. Sample preparation

Wear gloves before starting and during the assay. Airborne allergens and dirty laboratory equipment lead to contamination of the assay. Therefore, please notice the following recommendations:

- Clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment before and after each sample preparation.
- Carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure.

The samples should be stored in a cool place, protected against light.

It is recommended to work under a chemical hood, because the Extractor 3 contains ß-mercaptoethanol.

The Allergen extraction buffer (**AEB**) is provided as a 10-fold concentrate and must be diluted prior use. 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 dist. water (e.g. 100 mL buffer concentrate + 900 mL dist. water). The diluted AEB is stable at 20 – 25 °C (68 - 77 °F) for approx. 4 weeks or at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 12 weeks.

Make sure to heat the AEB in time in the 60 °C (140 °F) water bath (the 100 °C / 212 °F water bath is used for the extraction of the samples).

For extraction according to 9.2 (foods containing tannins and polyphenols), the diluted AEB must be mixed with 0.25 % casein and 1 % PVP (= **casein-PVP-**

AEB) (e.g., 20 mL diluted AEP + 0.05 g casein + 0.2 g PVP). The components dissolve better if the AEB has been preheated to 60 °C. The diluted casein-PVP-AEB can be stored at 2 - 8 °C for approx. 7 days.

In the following section, the following abbreviations are used:

- AEB: final diluted Allergen extraction buffer
- casein-PVP-AEB: AEB with addition of casein and PVP

9.1 Extraction with AEB (without casein and PVP)

Preheat the AEB to 60 °C (140 °F) in a water bath before sample extraction.

Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) well a sufficient amount (e.g. 50 g or 50 mL) to ensure taking a representative test portion of sample.

- Weigh 1 g of the sample (or 1 mL in case of liquid samples) into a fresh vial, add 2.5 mL Extractor 3 and 17.5 mL (or 16.5 mL in case of liquid samples) preheated and diluted AEB (see chapter 9).
- Close the vial and mix the sample thoroughly (e.g. vortex).
- Extract for 10 min at 100 °C (212 °F) in a boiling water bath (the entire sample tube should be covered with boiling water).
- Let the sample cool down shortly (e.g. 3 - 5 min in an ice bath).
- Centrifuge: 10 min, mind. 2500 x *g*, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract
  Alternatively, 2 mL of the extract can be centrifuged for 10 min at high speed (> 10,000 x *g*) in a microcentrifuge.
- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The extracts must always be diluted with AEB before use in the test (see chapter 10.2).

Note

The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted in a well-sealed container at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until used in the test (shelf life approx. 3 days). Unused extracts can also be stored undiluted at -20 °C (- 4 °F) for several months.

9.2 Extraction of tannin- and polyphenol-containing foods such as spices, chocolate, coffee (using casein and PVP)

Preheat the casein-PVP-AEB to 60 °C (140 °F) in a water bath before sample extraction.

Homogenize (grind thoroughly to powder and mix well or mix well a solution respectively) well a sufficient amount (e.g. 50 g or 50 mL) to ensure taking a representative test portion of sample.

- Weigh 1 g of the sample (or 1 mL in case of liquid samples) into a fresh vial, add 2.5 mL Extractor 3 and 17.5 mL (or 16.5 mL in case of liquid samples) preheated and diluted casein-PVP-AEB (see chapter 9).
- Close the vial and mix the sample thoroughly (e.g. vortex).
- Extract for 10 min at 100 °C (212 °F) in a boiling water bath (the entire sample tube should be covered with boiling water).
- Let the sample cool down shortly (e.g. 3 - 5 min in an ice bath).
- Centrifuge: 10 min, mind. 2500 x *g*, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract
  Alternatively, 2 mL of the extract can be centrifuged for 10 min at high speed (> 10,000 x *g*) in a microcentrifuge.
- Transfer the supernatant into a fresh vial.
- If the supernatant is not free of particles after centrifugation, filter the extract additionally.
- The extracts must always be diluted with AEB before use in the test (see chapter 10.2).

Note

The extract (supernatant of centrifugation step or filtrate) can be stored undiluted at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days. Unused extracts can also be stored at -20 °C (-4 °F) for several months.

10. Test procedure

10.1 Test preparation

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

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

The **wash buffer** is provided as a 10-fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1 + 9) with dist. water (e.g. 450 mL dest. water + 50 mL buffer concentrate). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for 4 weeks or for 3 months at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Kit components should be stored immediately at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) when no longer required.

10.2 Test procedure

The extracts prepared according to chapter 9.1 and 9.2 must be diluted 1:5 (1+4) with AEB (see chapter 9) before use (e.g. 400 µL AEB + 100 µL sample).

Carefully follow the recommended washing procedure to obtain unambiguous results. Do not allow microwells to dry between work steps.

Do not use more than three microtiter plate strips (24 wells) at a time. If more than three strips are needed, a second uncoated plate (see chapter 5.1) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate due to pipetting. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µL per well) and then exactly 100 µL are 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.

Avoid direct sunlight during all incubations. Therefore, cover the microtiter plates.

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. Pipette 100 µL of each standard or sample extract (prepared according to chapter 9 and diluted according to chapter 10.2) in duplicate to the wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
4. Add 100 µL of the conjugate to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour out the liquid of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) on absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µL diluted wash buffer (see chapter 10.1) and pour out the liquid as before. Repeat two more times (a total of three wash cycles).
6. Add 100 µL of the reddish substrate/chromogen to each well and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Pipette 100 µL of stop solution into each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the extinction at 450 nm. Read within 10 min after addition of stop solution.

11. Evaluation

Special software, **RIDASOFT® Win.NET Food & Feed (Art. No. Z9996FF)**, is optional available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays. The evaluation should be done using the cubic spline function.

Higher absorption values (A_{450nm}) of the calibration curve, especially for the zero standard, as mentioned on the certificate may be a result of insufficient washing or a soy contamination of reagents.

A further sample dilution and new determination is recommended for samples with an absorption (A_{450nm}) > standard 5. In case of further dilution, the additional dilution factor must be taken into account when calculating the result. Further dilutions should be carried out with allergen extraction buffer (AEB).

It must be clarified that all quality criteria are met for the current test run. The course of the standard curve can be taken from the quality assurance certificate (certificate of analysis, CoA), which is available via the QR code on the test kit label. As the absorbance values in the laboratory may differ from those stated

on the certificate, it is recommended to compare the ratios of the standards to each other with those on the certificate. For this purpose, the B/B_{max} values (the ratio of the absorbance values of the standards to the highest standard) are compared with each other. In the current test run, these should be similar to the ratios of the standards on the certificate.

When working according to these instructions for use, the samples are diluted 1:100 during extraction. The sample dilution factor of 100 is already taken into account in the concentration data of the standards (see chapter 4*). The concentration of soy protein in the sample can therefore be read directly from the standard curve.

For sample dilutions of more than 1:100 the further dilution factor must be considered for the calculation of the soy protein concentration. E.g. if a sample is tested for 1 % soy flour concentration (corresponding to 10,000 mg/kg soy flour or approx. 3,900 mg/kg soy protein), the sample has to be diluted 1:70,000 (1:100 according to the sample preparation and additional 1:700 with AEB).

The assay can also be evaluated when running in single determinations. This has no influence on the function of the test kit. A special assay evaluation must be written in the RIDASOFT® Win.NET software for this purpose. It is not present by default. Each laboratory may decide to perform the test in single determinations after a qualified risk management analysis. However, it is not consistent with standards like EN 15633-1 and EN 15842. It should be noted that this increases the risk of overlooking errors in the performance of the test (e.g. pipetting errors). Moreover, a higher result variation will occur when pipetting in single determinations.

12. Result interpretation

Results between LoD and LoQ indicate a low allergen concentration in the sample. Depending on the matrix tested, values below the LoQ can still be determined with sufficient precision (CV < 30 %). However, values in this range are generally subject to greater uncertainty due to the higher fluctuation range of the test. If the precision of the test has not been validated with a specific sample matrix, results below the measuring range should therefore not be reported with a quantitative value, but qualitatively "< LoQ". Further information on this can be found in the current validation report.

A result below the LoD does not exclude an allergen contamination below the detection limit of the assay, or that other allergen components, such as lipids, may be present in a sample. The result should be reported accordingly.

13. Limits of the method

Test results may vary depending on the sample matrix, the actual test procedure and the laboratory environment.

Detection and quantification limits depend on the respective sample matrix, the degree of processing and the extraction method.

The protein content and protein composition may vary in different soy varieties. Different varieties of soy can therefore provide different results, as the test is calibrated against an exemplary soy flour used in the standard material.

Technical limits of the test method are approached outside the designated measurement range resulting in higher variation. This may cause a switch of results between the different areas of the calibration curve especially at the test characteristic boundaries (LoD, LoQ, upper limit of measurement range).

An incorrect weight of the sample to be analyzed will have a 1:1 effect on the measurement result (e.g. a 10 % higher concentration is measured with a weigh in of +10 %). A sufficient accuracy is given with a fluctuation of max. ±1 %.

For the present ELISA, only individual, exemplary foods from different product categories could be validated due to the large number of foods. When analyzing a non-validated matrix, it is recommended to verify the results obtained by means of spike experiments. If necessary, a validation of the sample matrix of interest will need to be performed.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. These can lead to false-positive or increased results, but also reduce or suppress a correct reaction. Such matrix effects are independent of the specificity of the antibody used in the test and can be made visible by spiking experiments. For detailed information on potential matrix effects of individual foods, please refer to the validation report.

In processed foods (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented and this may have an impact on the recovery and assay results.

Allergens in heat-treated samples are not completely detected by the antibody used. Recovery depends on type and duration of heat treatment, so that recovery can be significantly reduced in highly heated samples.

Cross reactivities are side reactions of the antibody used for preparing the test kit with antigen showing similar epitopes as the investigated analyte. These appear especially with antigens from closely related species. In contrast to

matrix effects, it is a specific reaction of the antigen with the antibody. The antigen structures are subject to similar influences (e.g. by heating or drying) as for the actual analyte. In single cases, cross-reactivities can be lost or only become apparent through the processing of foods.

For evaluation of the cross reactivity, only one representative sample was analyzed. Other samples may show a different result. All analyzed cross reactivities are described in the validation report.

For detailed results and further information for other food matrices, please refer to the current validation report. In addition, data on individual foods may be available from comparative laboratory tests and inter-laboratory comparisons.

14. Recommendation

In order to ensure a high analytical performance, we recommend:

- To comply with the general quality assurance requirements for laboratories as listed in the standards EN 15633-1 and 15842 (e.g. performing duplicate determinations).
- Pre-flush pipette tips with standard or sample extract prior to pipetting.
- Carry along test controls for quality control. Allergen-free and allergen containing (spiked) samples should be used.
- In case of extremely acidic or basic samples, adjust the sample's pH value (pH 6.5 - 7.5) to neutral prior to extraction.
- To perform PCR (e.g. SureFood®) for confirmation of the result.
- To contact sales@r-biopharm.de if automates (e.g. ThunderBolt®, GEMINI or ChemWell®) are used.

15. Further application notes

- Sample preparation for caseinates ("Analysis of Caseinates and Casein hydrolysates")
- Swabbing method for allergen ELISA ("Allergen swabbing using RIDASCREEN® allergen ELISAs")

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

Version overview

Version number	Chapter and title
2016-07-18	previous version
2025-10-01	Current version Changes made: - General linguistic and formal revision - Removal of reference to “Set of 3 processed Soya Assay Controls” (item no. R7132); product has been discontinued - Updated list of related products and accessories for soy determination - Completion of Chapter 5 - Modification of the disposal clause in chapter 6. - Changes to Chapter 9: • Preparation of required buffers for foods containing tannins and polyphenols moved from chapter 9.3 to chapter 9 • Merger of sample preparation 9.1 and 9.2 (now 9.1) • Relocation of necessary dilution for use in tests from chapter 9.1, 9.2, and 9.3 to chapter 10.2 • Creation and revision of chapter 11, 12, 13 and 14 - Addition of version overview and symbol explanation - Adaptation of disclaimer

Explanation of symbols

General symbols:

Follow the instructions for use

Batch number

Expiry date (YYYY-MM-DD)

Storage temperature

Article number

Number of test determinations

Manufacturing date (YYYY-MM-DD)

Manufacturer + address

Disclaimer

1. In conformance with the German Civil Code (“BGB”)R-Biopharm AG provides a limited warranty (“Gewährleistung”) against defects in design and manufacture present at delivery that make the Product unsuitable or unsafe for the contractually specified Product use and location through properly qualified personnel. Such limited warranty warrants Product title and against such material Product defects for 12 months, or if the Product is provided with a shelf life, the length of the declared shelf life, calculated from the date of risk transfer pursuant to delivery terms, and further provided customer provides timely and proper notice of the defect.
   ALL OTHER WARRANTIES OR GUARANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, OF ANY KIND ARE EXCLUDED, WHETHER IMPLIED BY CUSTOM, PRACTICE, THE COURSE OF DEALING BETWEEN THE PARTIES OR OTHERWISE. The responsibility for any express or implied warranties or extensions of R-Biopharm’s own warranty made by dealers, distributors, or resellers is solely with such dealer, distributor, or reseller, and R-Biopharm AG expressly disclaims liability for such warranties.
2. R-Biopharm Products are designed for sole use by properly trained and qualified personnel applying appropriate industry standards and practices. Defects are covered only to the extent that such defects are demonstrably the result of defective material, design, parts, or faulty workmanship, which affect safety or result in substandard performance below specifications. R-Biopharm AG is not liable for any improper use nor the consequences of
   a. the failure to read, understand and follow use and safety instructions, or use proper preparation and storage;
   b. the failure to utilize trained and unqualified personnel, suitable samples or sampling techniques;
   c. chemical, electromagnetic, mechanical, or electrolytic influences outside R-Biopharm AG provided standard perimeters through product specific data sheets, written product descriptions, or as otherwise expressly agreed upon in writing; or
   d. any combination thereof.
3. R-Biopharm AG is also not liable for any changes or modifications, not carried out by R-Biopharm AG, nor consequences of use, applications, or processing which are unsafe or otherwise inconsistent with intended Product purpose as limited by written Product descriptions and specifications of R-Biopharm AG.
4. R-Biopharm AG’s liability for ordinary breach of contract is limited to repair, replacement, other substitute performance, or refund. The choice of remedies is within R-Biopharm AG’s sole discretion. R-Biopharm AG is not contractually liable for any incidental, or consequential damages, including but not limited to purchaser’s expenses, losses, or damages from loss of good will, frustrated business purposes, sales expectations, investment loss, actual or anticipated lost profits, End User indemnity, or any other business expenditures.
5. The foregoing limited warranty is solely intended to fulfill the warranty requirements (“Gewährleistung”) implied by German Civil Code. It is not intended to extend the scope or period of such Gewährleistung or provide additional warranties. Nor is this Disclaimer otherwise intended to limit or extent mandatory liability for damages in tort resulting from injury to life, body, or health, for intentional or grossly negligent acts, fraud, or due to strict liability under applicable product liability laws. A reversal of the burden of proof or rules of contract interpetation is not intended.

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),
Ute Salzbrenner, Dr. Frank Apostel,
Dr. Frank Vitzthum
Handelsregister / Commercial Register:
Amtsgericht Darmstadt HRB 8321