

# DUROTEST® S

Cod. Prodotto: P10, P10A

Test a membrana e reagenti per la determinazione semi-quantitativa dell'adulterazione della semola di grano duro con grano tenero in semola.  
Solo per uso in vitro.

P10/V21/12.08.21

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



**R-BIOPHARM**  
**RHÔNE LTD**

## Contenuto

	<b>Pag</b>
Principio del Test.....	3
Componenti del Kit.....	3
Reagenti Non Forniti .....	3
Rischi .....	3
Conservazione e Durata .....	4
Preparazione del Tampone di Lavaggio (Etichetta Verde).....	4
Preparazione del Campione .....	5
Lettura dei Risultati del Test.....	6
Qualità .....	6
Supporto Tecnico.....	6
Garanzia.....	6

## Principio del Test

Il kit impiega un anticorpo monoclonale specifico per la friabilina, una proteina presente nei frumenti teneri ma non nel grano duro. I campioni da analizzare vengono estratti e applicati sulla strip di nitrocellulosa, dove vengono assorbiti. La porzione non trattata della strip viene saturata con un agente bloccante per impedire qualsiasi legame non specifico dell'anticorpo. Viene quindi aggiunto un anticorpo monoclonale legato all'enzima, specifico per la proteina friabilina. Se il campione è contaminato da grano tenero si forma un complesso immune tra la friabilina fissata e l'anticorpo legato all'enzima. La strip viene quindi lavata per eliminare l'anticorpo in eccesso o non legato. Con l'aggiunta di un agente per la colorazione, sulla membrana si forma un deposito blu/porpora in presenza dell'anticorpo legato all'enzima. Il grado di colorazione sviluppato è proporzionale alla percentuale di grano tenero presente nel campione. L'assenza di colorazione è indice di un grano duro al 100 %, quindi di contaminazione zero (no adulterazione).

Il tempo richiesto per l'analisi è di circa 35 minuti. I risultati possono essere confrontati con uno standard di grano tenero al 3 % fornito per ottenere un risultato semi-quantitativo.

## Componenti del Kit

- 20 x strip a membrana
- 1 flacone contenente 50 ml di tampone di estrazione pronto all'uso
- 2 flaconi contenenti 50 ml di tampone di lavaggio concentrato 10 volte (etichetta verde)
- 20 provette per incubazione contenenti 60 mg di agente bloccante
- 80 provette per microcentrifuga
- 1 flacone contenente 1.5 ml di anticorpo-HRP coniugato (etichetta rossa) (P10A)
- 20 pipette in plastica
- 1 flacone contenente 33 ml di reagente di colorazione A (etichetta blu)
- 1 flacone contenente 33 ml di reagente di colorazione B (etichetta blu con macchia bianca sul coperchio)
- 2 g di campione standard 1: 100 % grano duro (etichetta grigia e macchia nera sul coperchio)
- 2 g di campione standard 2 : 3 % grano tenero (etichetta arancione)

Nota: L' anticorpo HRP-coniugato (P10A) deve essere spedito separatamente a causa delle diverse condizioni di conservazione

## Reagenti non forniti

- Acqua distillata o deionizzata (adatta per HPLC, ad esempio MilliQ)

## Rischi

Evitare il contatto con la cute dei seguenti reagenti:

- Tampone di estrazione: contiene sodio dodecil solfato
- Reagenti di colorazione A e B: contengono metanolo / perossido di idrogeno

Durante le analisi è necessario indossare indumenti protettivi come camici, guanti e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, è possibile contattare il distributore locale R-Biopharm e richiedere la scheda di sicurezza.

## **Conservazione e Durata**

Il kit ha una durata di 12 mesi dalla data di produzione se conservato a 2 - 8 °C.

Nota: L' anticorpo HRP-coniugato (etichetta rossa) (P10A) deve essere conservato a -20 °C ma rimane stabile a temperature superiori a quelle di refrigerazione fino a 4 giorni durante il trasporto.

## **Preparazione del Tampone di Lavaggio (Etichetta Verde)**

Il tampone di lavaggio deve essere preparato fresco nel giorno dell'analisi ed utilizzato entro 24 ore.

1. Diluire un sufficiente volume di tampone di lavaggio con acqua (1 : 10 (v/v)). Per una strip diluire 5 ml di tampone di lavaggio con 45 ml di acqua.
2. Assicurarsi che il tampone di lavaggio sia a temperatura ambiente prima dell'uso.

## Preparazione del Campione

1. Pesare 100 mg (oppure 0.1 ml) di campione tritato in una provetta per microcentrifuga fornita con il kit.
2. Miscelare ciascuno standard per inversione, prelevarne 100 mg (oppure 0.1 ml) di ciascuno ed introdurla in una ulteriore provetta per microcentrifuga fornita con il kit.
3. Estrarre ciascun campione addizionando 0.5 ml di tampone di estrazione e miscelare accuratamente aspirando il liquido con la pipetta oppure per inversione.
4. Attendere 3 minuti e ripetere la procedura di miscelazione.
5. Agitare i campioni in una microcentrifuga per chiarificare il surnatante (oppure far depositare la fase solida) Se si estraggono grossi quantitativi di campioni, miscelare bene, filtrare ed utilizzare il filtrato nel saggio.
6. Prelevare la strip tenendola dalla parte del supporto in plastica trasparente ed evitando di toccare la superficie bianca della membrana. Appoggiarla su una superficie piana e pulita con la membrana assorbente (lato opaco) rivolta verso l'alto.
7. Applicare con cautela 5 µl di ciascun surnatante da analizzare sulla membrana assorbente bianca posizionando il puntale della pipetta al centro della strip. Su ciascuna strip applicare un massimo di 4 campioni (2 standard e 2 campioni non noti). Far assorbire i campioni dalla strip per 5 minuti.
8. Aggiungere 3 ml di tampone di lavaggio alla provetta di incubazione graduata Tappare nuovamente e miscelare.
9. Togliere il tappo e inserire la strip (introducendola dalla parte della membrana ) nella soluzione bloccante.
10. Incubare la strip per 5 minuti, agitandola per bloccare al meglio l'attività della membrana.
11. Estrarre la strip dalla provetta e appoggiarla su un foglio di carta pulito.
12. Aggiungere 2 gocce di anticorpo-HRP coniugato (flacone con etichetta rossa) nella provetta della soluzione bloccante utilizzando la pipetta in plastica. Mescolare per inversione.

**Nota:** Utilizzare una pipetta di plastica nuova per ogni campione

13. Inserire nuovamente la strip nella soluzione ed incubare per 20 minuti, agitandola di tanto in tanto durante l'incubazione.
14. Estrarre la strip e sciacquarla con il tampone di lavaggio, possibilmente utilizzando un flacone di lavaggio. Eliminare il contenuto della provetta e sciacquarla con il tampone di lavaggio. Rimettere la strip nella provetta e riempire quest'ultima con il tampone di lavaggio. Agitare la strip per raccogliere tutto l'anticorpo non legato. Eliminare nuovamente il tampone. Ripetere l'intera operazione di lavaggio della strip per altre 5 volte.

Nota: Lavare scrupolosamente la strip per evitare un'elevata colorazione di background durante lo sviluppo del colore.

15. Togliere nuovamente la strip dalla provetta e appoggiarla su una superficie pulita.
16. Svuotare e capovolgere la provetta su un foglio di carta per eliminare ogni traccia di tampone. Sciacquare e lasciar asciugare il tappo. Addizionare nella provetta 1.5 ml di reagente di colorazione A (etichetta blu) e poi 1.5 ml di reagente di colorazione B (etichetta blu con macchia bianca sul coperchio). Tappare e miscelare i reagenti con cura.
17. Introdurre la strip nella miscela di reagenti di colorazione e lasciar reagire per 2 - 10 minuti al buio. Durante questo periodo controllare spesso la strip per seguire la comparsa della colorazione nello standard 2 (ovvero lo standard di grano tenero al 3 %) e in ciascun campione positivo.
18. Sciacquare la strip con acqua distillata per impedire un'eccessivo sviluppo della colorazione. Il colore che si ottiene è instabile e sbiadisce in fretta man mano che la strip si asciuga, quindi è consigliabile eseguire in

## Letture dei Risultati del Test

Standard	
Standard di Semola di Grano Duro al 100 %	Standard di Semola di Grano Tenero al 3 %
Nessuna colorazione / colore bianco	Colore blu / porpora

Campioni	
Livello di Colorazione	Livello di Adulterazione
> standard di grano tenero al 3 %	>3 % di grano tenero
< standard al 3 %	<3 % di grano tenero
Nessuna colorazione	Nessuna adulterazione

## Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, prodotti, verificati e spediti in accordo con le normative dei sistemi registrati di gestione della qualità ISO 9001 e ISO 13485 che ne assicurano l'alta e costante qualità e la rispondenza ai requisiti di performance da noi stabiliti. I nostri prodotti sono stati impiegati in molti studi collaborativi per l'elaborazione di metodi standard europei e internazionali e sono largamente utilizzati dai principali enti, industrie alimentari e laboratori governativi. Referenze sui prodotti RBR per i clienti sono disponibili su richiesta.

## Supporto tecnico

Sensibile alle richieste di assistenza e suggerimenti che possono emergere da parte della clientela, RBR offre i seguenti servizi:

- Analisi dei campioni problematici
- Procedure per campioni difficili
- Referenze dalla letteratura della biblioteca RBR
- Installazione e supporto della KOBRA® CELL
- Consulenza per i parametri di rilevazione
- Consulenza per la preparazione e la manipolazione degli standard
- Aggiornamenti sulle normative e sulla preparazione dei campioni e altre notizie via e-mail
- Fornitura di campioni arricchiti

Contattare il rivenditore R-Biopharm di zona per ulteriori informazioni.

## Garanzia

R-Biopharm Rhône Ltd non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultasse difettosi, R-Biopharm Rhône Ltd si impegna a fornire prodotti sostitutivi. L'utilizzatore si assume qualsiasi rischio e responsabilità derivante dall'impiego dei prodotti e delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo dei prodotti o delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd.



Prodotto da:  
**R-Biopharm Rhône Ltd**  
Scozia

Distribuito da:  
**R-Biopharm Italia Srl**  
Via Morandi, 10  
20077 Melegnano MI  
Tel: 02 9823 3330  
Fax: 02 9834 100  
info@r-biopharm.it