

RIDASCREEN[®]FAST Milk

Art. Nr. R4652

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Milchprotein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
milk protein

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard:

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales:

Fax:: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

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

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Milk (R4652) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Milchprotein in Lebensmitteln.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt.

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben).....ca. 45 min Testdurchführung (Inkubationszeit).....30 min
Nachweisgrenze:	0,7 mg/kg (ppm) Milchprotein
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg (ppm) Milchprotein
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist auf das Referenzmaterial NIST RM 1549a Vollmilchpulver kalibriert.
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch die Caseine sowie β -Lactoglobulin der Kuhmilch sowie der Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch.

Die Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z.B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z.B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z.B. Polyphenole) können durch Spikeversuche erkannt werden.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot:

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612)

RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4902)

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. Nr. 4901)

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

RIDA® Extractor 2 (Art. Nr. R4613)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Milk ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Milchprotein in Lebensmitteln, die Molke, Milch oder Milchpulver enthalten können, wie Wurst, Eis, Schokolade, Backwaren, Backmischungen, Suppen, Saucen, Dressing und Getränken (Saft, Wein, Bier). Die Testergebnisse sind quantitativ wenn die Probe Milch oder Milchpulver enthält. Wenn die Milchprotein-Zusammensetzung der Probe unbekannt ist und das Milchprotein Verhältnis anders ist als das natürliche Verhältnis in Milch (z.B. Proben die hauptsächlich aus Molke bestehen), dann können die Ergebnisse unterbewertet sein.

Wenn ein quantitatives Ergebnis für Casein und/oder β -Lactoglobulin erforderlich ist, dann sollten die Proben mit RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) und/oder RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (R4902) untersucht werden.

2. Allgemeines

Kuhmilch enthält ca. 3,2 % Protein, das zu 10 % aus β -Lactoglobulin (Leitprotein der Molke) und zu 80 % aus Caseinen besteht. Als Allergen ist das β -Lactoglobulin (vor allem für Kinder) von größter Bedeutung, während beim Erwachsenen eher das Casein als Allergen zu dominieren scheint.

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **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.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Caseine und β -Lactoglobulin beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Milchproteine an die spezifischen Antikörper. In einem

Waschschritt werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich) Komplex. Nicht gebundenes Konjugat wird nachfolgend durch Waschen entfernt. Der Nachweis von Milchproteinen erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Konjugat wandelt das 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 ist proportional zu der Milchproteine Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Milchproteine angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
3 x Extractor 2 3 x Extraktor 2	blau	Konzentrat	2x	30 ml
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	grün	Konzentrat	10x	100 ml
Additive 1 Additiv 1	blau			2 g
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	7,5 mg/kg*	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	22,5 mg/kg*	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	67,5 mg/kg*	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Conjugate buffer Konjugat Puffer	schwarz	gebrauchsfertig		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 normalen Probenvorbereitung ergibt. So können die Milchprotein-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Wasserbad 60 °C und 100 °C
- Papierfaltenfilter
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- destilliertes Wasser
- 1 M Salzsäure (HCl)
- 1 M Natronlauge (NaOH)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das rötlich gefärbte Substrat-/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

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

9.1. Vorbereitungen

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

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als **10fach Konzentrat** vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen lösen (Wasserbad 37 °C) und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z.B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Allergen Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

Um den finalen **Allergen Extraktionspuffer mit Zusatz von Additive 1 (A-AEP)** herzustellen, müssen 1,35 g Additive 1 in ein Becherglas eingewogen und mit 15 ml 1 M NaOH gelöst werden. Rühren bis sich das Additive 1 gelöst hat. Dann 700 ml verdünnten Allergen Extraktionspuffer (s.o.) in einen Messzylinder geben. Unter konstantem Rühren die 15 ml Additive 1-Lösung dazugeben, evtl. Reste der Additive 1-Lösung mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer aufnehmen und in den Messzylinder überführen. Den mit Additive 1 versetzten Allergen Extraktionspuffer (A-AEP) mit 1 M HCl auf pH 9 einstellen und mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer auf 750 ml auffüllen.

750 ml A-AEP reicht für ca. 45 Proben. Der Puffer ist ca. 3 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar (**nicht** im Kühlschrank aufbewahren). Saubere Flaschen benutzen, da Stäube als Kristallisationskeime vermieden werden sollten. Den Puffer verwerfen, sobald Kristalle ausfallen.

Die **Extractor 2** liegt als 2fach Konzentrat vor und muss 1:2 (1+1) mit dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 30 ml Extractor 2 + 30 ml dest. Wasser). Der komplett verdünnte Extractor 2 ist ausreichend für 45 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C).

9.2. Probenextraktion

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren

feste Proben:

- 1 g Probe abnehmen und mit 4 ml final verdünntem Extractor 2 (siehe 9.1.) versetzen, gut mischen und verschließen, für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- 16 ml erwärmten (60 °C) A-AEP (siehe 9.1.) zu der gekochten Probe geben

flüssige Proben:

- 1 ml Probe abnehmen und mit 4 ml final verdünntem Extractor 2 (siehe 9.1.) versetzen, gut mischen und verschließen, für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- 15 ml erwärmten (60 °C) A-AEP (siehe 9.1.) zu der gekochten Probe geben

feste und flüssige Proben wie folgt weiter bearbeiten:

- gründlich mischen (Schüttler)
- anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) extrahieren
abkühlen lassen (z.B. Eisbad), zentrifugieren für 10 min / 2500 g und/oder
filtrieren (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in
einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den Überstand filtrieren (mit einem Papierfaltenfilter)
- den filtrierten Überstand 1:5 (1+4) mit final verdünntem Allergen Extraktions-
puffer, ohne Additiv 1 (siehe 9.1.) verdünnen, z.B. 100 µl Überstand + 400 µl
Puffer (1:100 final)
(**Anmerkung:** diesen verdünnten Überstand unmittelbar in den Test einsetzen)
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden wird für die Aufarbeitung von Sonnenblumenkernen-, Kürbiskernen- und Pinienkernen- enthaltenden Matrices die Zugabe von 0,5 g BSA empfohlen (für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte sales@r-biopharm.de).

Die mittels Extractor 2 erhaltenen Extrakte können auch im RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (R4902) und im RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) eingesetzt werden.

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen ELISA

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

Das **Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugat nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Konjugatpuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Puffer, 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. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). 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 vier Wochen bei 2 - 8 °C.

10.2. Testdurchführung

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (z.B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Duplikate in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saug-

- fähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat zu allen Kavitäten geben, vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
 5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen.
 6. Je 100 µl rot gefärbte Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
 7. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die 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.

Höhere Extinktionswerte ($E_{450\text{ nm}}$) der Eichkurve im Vergleich zu den Daten lt. Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Milchprotein-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen.

Bitte beachten:

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

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:100 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Milchprotein-Konzentration berücksichtigt werden.

Generell:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass andere Komponenten, wie z.B. Lipide, in einer Probe enthalten sein können.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. In prozessierten Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden, dies kann die Wiederfindung beeinträchtigen.

Anmerkungen:

Unterschiedliche Milchbestandteile wie Milchpulver, Molke (β -Lactoglobulin), Caseinate, etc. werden Lebensmittelprodukten zugesetzt. RIDASCREEN®FAST Milk ist auf Magermilchpulver kalibriert. Daher gilt, wenn das untersuchte Lebensmittel

- Magermilchpulver oder Milch enthält, sind die ELISA Ergebnisse quantitativ
- Molke (β -Lactoglobulin) enthält, können die ELISA Ergebnisse unterbewertet sein
- Caseinate enthalten, können die ELISA Ergebnisse unterbewertet sein.

Wenn ein quantitatives Ergebnis für Casein und/oder β -Lactoglobulin erforderlich ist, dann sollten die Proben mit RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) und/oder RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (R4902) untersucht werden.

Bei einem Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze, können im Lebensmittel noch weitere Milchbestandteile (z.B. Zucker wie Lactose) vorhanden sein.

Milch enthält ungefähr 3,2 % Milchproteine. Damit entspricht eine Probe mit einem Gehalt von 1 mg/kg Milchprotein einem Milchgehalt von ca. 31 mg/kg Milch.

Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung sollten Spike Versuche durchgeführt werden.

- Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für fragmentierte Proteine vermindert, daher sollten entsprechende Proben mit einem kompetitiven ELISA Testsystem, wie dem RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (R4901), analysiert werden.
- sollte eine Analyse mittels dem ChemWell® oder GEMINI Automaten erfolgen, wenden Sie sich für weitere Informationen bitte an info@r-biopharm.de

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte R-Biopharm AG.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN®FAST Milk

Brief information

RIDASCREEN®FAST Milk (R4652) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of milk protein in food.

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

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples)approx. 45 min test implementation (incubation time) 30 min
Limit of detection:	0.7 mg/kg (ppm) milk protein
Limit of quantification:	2.5 mg/kg (ppm) milk protein
Standard material:	The RIDASCREEN® standard material is calibrated to the reference material NIST RM 1549a whole milk powder.
Specificity:	The antibodies specifically detect caseins as well as β -lactoglobulin of cow's milk and of sheep's, goat's and buffalo's milk.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. corn bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products:

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612)

RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4902)

RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. No. 4901)

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

RIDA® Extractor 2 (R4613)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Milk is a sandwich enzyme immunoassay to quantify milk proteins in food containing whey, milk or milk powder such as sausages, ice cream, chocolate, bakery goods, cake and bread mix, soups, sauces, dressings and beverages (juice, wine, beer). The assay results are quantitative if the sample contains milk or milk powder. If the milk protein composition of the sample is not known and the milk protein ratio is different than the natural ratio in milk (e.g. a sample primarily consisting of whey), the results may be underestimated.

If a quantitative result for caseins and/or β -lactoglobulin is requested, the sample should be tested in the RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) and/or the RIDASCREEN®FAST β -lactoglobulin (R4902).

2. General

Cow's milk contains 3.2 % proteins which consist of 10 % β -lactoglobulin (leading protein of whey) and 80 % caseins. The most important allergen for children is β -lactoglobulin while the caseins become to be dominant later in adults.

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.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to caseins and β -Lactoglobulins. By adding standards and samples to the wells, milk protein present will bind to the specific antibodies. In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase is added. This antibody conjugate is bound to the Ab-Ag-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The detection of milk protein takes place by adding

Substrate/Chromogen. The enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the milk proteins concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg milk proteins.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
3 x Extractor 2	Blue	Concentrate	2x	30 ml
Allergen Extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Additive 1	Blue			2 g
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	7.5 mg/kg*	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	22.5 mg/kg*	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	67.5 mg/kg*	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Conjugate buffer	Black	Ready to use		7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*) **The dilution factor 100** which results after sample preparation has already been considered for the standard concentrations. Therefore, the milk protein concentrations of the samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal vials
- water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F)
- fluted paper filter
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- distilled water
- 1 M hydrochloric acid (HCl)
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). **Do not freeze any test kit components.**

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the red stained Substrate/Chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for standard 5

9. Preparation of samples

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.

9.1. Preparations

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

The **Allergen Extraction buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before dilution of the buffer concentrate completely dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99°F) and mix well. Following this, dilute the heated buffer concentrate 1:10 (1+9) with distilled water before use (i.e. 100 ml buffer concentrate 900 ml distilled water. The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. twelve weeks.

For the preparation of the **Allergen Extraction buffer containing Additive 1 (A-AEP)** weigh 1.35 g of Additive 1 in a glass beaker and add 15 ml 1 M NaOH. Stir until the Additive 1 is solved. Then fill 700 ml diluted Allergen Extraction buffer (see above) in a measuring cylinder. Add the 15 ml Additive 1 solution by stirring constantly, transfer eventually residues of the Additive 1 solution into the measuring cylinder by rinsing with diluted Allergen Extraction buffer. Adjust the Additive 1 containing Allergen Extraction (A-AEP) buffer to pH 9 with 1 M HCl and fill up to 750 ml with diluted Allergen Extraction buffer.

750 ml A-AEP buffer is sufficient for 45 samples. The buffer can be used for approx. 3 weeks at room temperature 20 - 25 °C (68 - 77 °F) (do **not** store in the refrigerator). Use clean bottles as particles of dust can initiate crystallization. Discard the buffer if crystals are present.

The **Extractor 2** is provided as 2fold concentrate and has to be diluted 1:2 (1+1) with distilled water (e.g. 30 ml Extractor 2 + 30 ml dist. water). The complete diluted Extractor 2 is sufficient for 45 samples and can be used for approx. 3 month at room temperature (20 - 25 °C).

9.2. Sample extraction

–homogenize a representative amount of the sample (5 - 50 g)

Solid samples:

- take 1 g sample and add 4 ml diluted Extractor 2 (see 9.1.), mix vigorously, close the vial and cook for 10 min at 100 °C in a water bath
- let the sample cool down shortly
- add 16 ml heated (60 °C) A-AEP (see 9.1.) to the cooked sample

Liquid samples:

- take 1 ml sample and add 4 ml diluted Extractor 2 (see 9.1.), mix vigorously, close the vial and cook it for 10 min at 100 °C in a water bath
- let the sample cool down shortly
- add 15 ml heated (60 °C) A-AEP to the cooked sample

further prepare solid and liquid samples as follows:

- mix vigorously (shaker)
- extract for 10 min at 60 °C in a water bath
- cool down (e.g. ice water), centrifuge for 10 min / 2500 g
(alternatively: 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- filter the supernatant (with fluted paper filter)
- dilute the sample 1:5 (1+4) with finally diluted Allergen Extraction Buffer, without Additive 1 (see 9.1.), e.g. 100 µl + 400 µl (1:100 final)
(**Remark:** use this diluted supernatant directly in the assay)
- use 100 µl per well in the assay

In order to suppress false positive results it is recommend to add 0.5 g BSA to the extraction of sunflower seeds, pumpkin seeds and pine nuts containing matrices (for more information please contact sales@r-biopharm.de).

Sample extracts with Extractor 2 can also be used both in the RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (R4902) and in the RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) assays.

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days. The extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for several months.

10. Test implementation

10.1. Test preparation for the ELISA

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

The **conjugate** (bottle with red cap) is provided as a 11fold concentrate. Since the diluted conjugate 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 conjugate buffer (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml conjugate buffer, sufficient for 2 microtiter strips).

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). 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 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for four weeks.

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

Do not use more than 3 strips (24 wells) at a time. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and then quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

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 100 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
4. Add 100 µl of the diluted conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
6. Add 100 µl of the reddish Substrate/Chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win / RIDA[®]SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The calculation should be done by use of a cubic spline function. The course of the

standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

In comparison with the certificate, higher values of the absorbance ($A_{450\text{ nm}}$) for the calibration curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or milk protein contamination.

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

Please note:

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 100. The milk protein concentration can be read directly from the standard curve - the sample dilution factor of 100 is already taken into account for the standard concentrations (see 4. *).

For sample dilutions of more than 1:100 the further dilution factor must be considered for the calculation of the milk protein concentration.

In general:

Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like lipids for example.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. In processed food, proteins may be altered or fragmented; this may have an impact on the recovery.

Remarks:

Different milk components like milk powder, whey (β -lactoglobulin), caseinates, etc. are added to food products. RIDASCREEN®FAST Milk is calibrated to skim milk powder. Therefore, if the analyzed food contains:

- Skim milk powder or milk then the ELISA results are quantitative
- Whey (β -lactoglobulin) then the ELISA results may be underestimated
- Caseinates then the ELISA results may be underestimated.

If a quantitative result for caseins and/or β -lactoglobulin is requested, the sample should be tested in the RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) and/or the RIDASCREEN®FAST β -Lactoglobulin (R4902).

If the result is below the detection limit, further milk constituents (e.g. sugars like lactose) may be present in the food sample.

Milk contains approx. 3.2 % milk protein. Thus a sample which contains 1 mg/kg milk protein corresponds to a milk content of approx. 31 mg/kg milk.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

- Each sample material should be analyzed in duplicates
- Use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls
- Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. To ensure an accurate result spike experiments are recommended
- For details using ChemWell® or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

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

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321