

RIDASCREEN® T-2 Toxin

Art. No. R3801

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von T-2 Toxin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of T-2 Toxin

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® T-2 Toxin (Art. Nr. R3801) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 Toxin in Getreide und Futtermitteln. Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

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

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	extrahieren, zentrifugieren und verdünnen
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 30 min Probenvorbereitung (für 10 Proben) mit Säule ca.1h Testdurchführung (Inkubationszeit) 1 h 30 min
Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz)	<u>für Messbereich 3,5 – 56 µg/kg (ppb)</u> Gerste, Roggen, Mais, Weizen..... ca. 7 µg/kg (ppb) Hafer ca.11 µg/kg (ppb) <u>für Messbereich 35 – 560 µg/kg (ppb)</u> Mais, Weizen, Hafer ca. 30 µg/kg (ppb)
Wiederfindungsrate:	in künstlich kontaminierten Getreideproben90 % ± 10 %
Spezifität:	Die Spezifität des RIDASCREEN® T-2 Toxin-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen ermittelt. T-2 Toxin100 % Acetyl T-2 Toxinca. 114 % HT-2 Toxinca. 7 % Iso T-2 Toxinca. 2 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® T-2 Toxin Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten Werten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der

jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

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/lebensmittelfuttermittel-analytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Weitere T-2 und T-2/HT-2 Toxin Testsysteme

RIDA[®] QUICK T-2/HT-2 RQS (R5304)

RIDASCREEN[®] FAST T-2 Toxin (R3801)

RIDASCREEN[®] T-2/HT-2 Toxin (R3805)

TRILOGY[®] Liquid Standard T-2 Toxin (TSL-314)

TRILOGY[®] Dried Standard T-2 Toxin (TS-314)

TRILOGY[®] Liquid Standard HT-2 Toxin (TSL-333)

TRILOGY[®] Dried Standard HT-2 Toxin (TS-333)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN[®] T-2 Toxin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von T-2 Toxin in Getreide und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Das Mykotoxin T-2 Toxin gehört zur Gruppe der Trichothecene und wird von Pilzen der Fusarienarten gebildet. Man findet dieses Toxin häufig in landwirtschaftlichen Produkten, wobei die Kontamination und die Konzentrationen regional sehr unterschiedlich sind. Aufgrund der hohen zytotoxischen und immunsuppressiven Wirkungen stellt T-2 Toxin ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-T-2 Toxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes T-2 Toxin (Enzymkonjugat) und anti-T-2 Toxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes T-2 Toxin konkurrieren um die T-2 Toxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-T-2 Toxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes T-2 Toxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur T-2 Toxin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Microtiter plate M Mikrotiterplatte M		gebrauchsfertig	96 Kavitäten
Sample buffer Probenpuffer	weiß	gebrauchsfertig	60 ml
Standard 1 Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L 1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	0,1 µg/L 1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	0,2 µg/L 1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	0,4 µg/L 1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	0,8 µg/L 1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	1,6 µg/L 1,3 ml
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	6 ml
Antibody Antikörper	schwarz	gebrauchsfertig	6 ml
Substrate	grün	gebrauchsfertig	7 ml
Chromogen	blau	gebrauchsfertig	7 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig	14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Labor- oder Getreidemühle
- Magnetrührer
- Mixer
- Zentrifuge, Papierfilter
- Evaporator
- Glasröhrchen
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)

5.2. Reagenzien

- Methanol
- Acetonitril
- PuriTox Trichothecene; Produktnummer: TC-T220
- zur Probenverdünnung (für Verdünnungen > Verdünnungsfaktor 35):
PBS-Puffer, pH 7,2: (0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl auf 1000 ml Methanol/dest. Wasser 10/90 (v/v) auffüllen

Dieser Puffer muss 10 % Methanol enthalten, damit die Proben im Test immer in 10 % Methanol eingesetzt werden (siehe auch 9.1./9.2.).

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards enthalten T-2 Toxin, besondere Vorsicht ist geboten. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden (Handschuhe verwenden).

Die Dekontamination von Glasgeräten und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

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

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

T-2 Toxin ist lichtempfindlich, deshalb die T-2 Toxin-Standards vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Das farblose Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahme-Vorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren zerkleinern und mischen.

9.1. Getreide: Messbereich 3,5 – 56 ppb (Aufarbeitung unter Einsatz der Festphasensäule: PuriTox Trichothecene; TC-T220)

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und 20 ml Acetonitril/dest. Wasser 84/16 (v/v) zugeben
- die Probe 3 min kräftig mit einem Mixer mischen
- zentrifugieren: 10 min / $\geq 3000\text{ g}$ / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 6 ml Überstand durch die PuriTox Trichothecene (TC-T220) Säule pressen und das gereinigte Filtrat in einem Glasröhrchen auffangen; anschließend Luft durch die Säule drücken, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen

- 4 ml des gereinigten Filtrats unter einem Stickstoff- oder Luftstrom bei ca. 60 - 70 °C bis zur Trockene evaporieren
- trockenen Rückstand in 5 ml Methanol/dest. Wasser 70/30 (v/v) rekonstituieren
- Probe 1:7 (1+6) mit Probenpuffer (siehe 4.) verdünnen (z. B. 100 µl Probe + 600 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Hinweis: Die Probenaufarbeitung mittels PuriTox Trichothecene- Säule (TC-T220) wurde ursprünglich für die GC-Analyse von R-Biopharm Rhone entwickelt (siehe IFU TC-T220). R-Biopharm hat diese Methode für die ELISA Analyse modifiziert.

Anmerkung:

Bei hohen T-2 Toxingehalten (> 56 ppb) muss der 1:7 verdünnte Extrakt weiter verdünnt werden, z. B. 1:10 (1+9) mit PBS-Puffer, der 10 % Methanol enthält (siehe 5.2.), z. B. 50 µl verdünnter Extrakt + 450 µl PBS-Puffer mit 10 % Methanol.

9.2. Getreide und Futtermittel: Messbereich 35 – 560 ppb

- 5 g der zerkleinerten Probe einwiegen und in 25 ml Methanol/dest. Wasser 70/30 (v/v) lösen*)
- die Probe 3 min kräftig mit einem Mixer mischen
- den Extrakt über einen Papierfilter filtrieren oder zentrifugieren (10 min / \geq 3000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C))
- 100 µl Filtrat bzw. Überstand 1:7 (1+6) mit Probenpuffer verdünnen (z. B. 100 µl Filtrat oder Überstand + 600 µl Probenpuffer)
- den verdünnten Extrakt 1:10 weiter verdünnen; z.B. 50 µl verdünnten Extrakt + 450 µl PBS-Puffer mit 10% Methanol
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden, dazu muss das Volumen von Methanol/dest. Wasser 70/30 (v/v) angepasst werden z. B. 25 g in 125 ml Methanol/dest. Wasser 70/30 (v/v) oder 50 g in 250 ml Methanol/dest. Wasser 70/30 (v/v)

Anmerkung:

Bei hohen T-2 Toxingehalten (> 560 ppb) muss der 1:70 verdünnte Extrakt weiter verdünnt werden, z. B. 1:10 (1+9) mit PBS-Puffer, der 10 % Methanol enthält (siehe 5.2.), z. B. 50 µl verdünnter Extrakt + 450 µl PBS-Puffer mit 10 % Methanol.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

10.2. Testdurchführung

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

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl Standardlösung bzw. die vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren; für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl mit dest. Wasser waschen. Diesen Waschvorgang zweimal wiederholen.
6. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopplösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDASOFT® Win.NET (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die T-2 Toxin-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche T-2 Toxin-Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Getreide (9.1):	35 (bzw. 350)
Getreide, Futtermittel (9.2):	350 (bzw. 3500)

Der Messbereich des Tests liegt somit zwischen 3,5 und 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) T-2 Toxin, bei Probenaufarbeitung nach 9.1 bzw. zwischen 35 und 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) T-2 Toxin bei Probenaufarbeitung nach 9.2 für Getreide- und Futtermittelproben verwendet wird.

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® T-2 Toxin

Brief information

RIDASCREEN® T-2 Toxin (Art. No. R3801) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of T-2 toxin in cereals and feed.

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

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

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation: extraction, centrifugation and dilution

Time requirement: sample preparation
(for 10 samples) approx. 30 min
sample preparation with column
(for 10 samples) approx. 1 h
test implementation
(incubation time) approx. 1 h 30 min

Detection limit: Measuring range: 3.5 – 56 µg/kg (ppb)
(corresponding to standard substance) Barley, rye, corn (maize), wheat approx. 7 µg/kg (ppb)
oats approx. 11 µg/kg (ppb)

Measuring range: 35 – 560 µg/kg (ppb)
Corn (maize), wheat, oats approx. 30 µg/kg (ppb)

Recovery rate: in spiked cereal samples approx. 90 % ± 10 %

Specificity: T-2 toxin 100 %
Acetyl T-2 toxin approx. 114 %
HT-2 toxin approx. 7 %
Iso T-2 toxin approx. 2 %

The specificity of the RIDASCREEN® T-2 Toxin test was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the

respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

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 T-2 and T-2/HT-2 Toxin test systems

RIDA[®] QUICK T-2/HT-2 RQS (R5304)

RIDASCREEN[®] FAST T-2 Toxin (R3801)

RIDASCREEN[®] T-2/HT-2 Toxin (R3805)

TRILOGY[®] Liquid Standard T-2 Toxin (TSL-314)

TRILOGY[®] Dried Standard T-2 Toxin (TS-314)

TRILOGY[®] Liquid Standard HT-2 Toxin (TSL-333)

TRILOGY[®] Dried Standard HT-2 Toxin (TS-333)

1. Intended use

RIDASCREEN[®] T-2 Toxin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of T-2 toxin in cereals and feed.

2. General

T-2 toxin belongs to the trichothecene group of mycotoxins and is formed by fungi of the genus *Fusarium*. T-2 toxin is often found in agricultural commodities, although the incidence and the concentrations found show a broad regional variation. Due to its cytotoxic and immunosuppressive mode of action T-2 toxin is a threat for human and animal health.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-T-2 toxin antibodies. T-2 toxin standards or sample solutions, T-2 toxin enzyme conjugate and anti-T-2 toxin antibodies are added. Free T-2 toxin and T-2 toxin enzyme conjugate compete for the T-2 toxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-T-2 toxin antibodies are also bound by the immobilized

capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound 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 inversely proportional to the T-2 toxin concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format	Volume
Microtiter plate M		Ready to use	96 wells
Sample buffer	White	Ready to use	60 ml
Standard 1	White	Ready to use	0 µg/L 1.3 ml
Standard 2	White	Ready to use	0.1 µg/L 1.3 ml
Standard 3	White	Ready to use	0.2 µg/L 1.3 ml
Standard 4	White	Ready to use	0.4 µg/L 1.3 ml
Standard 5	White	Ready to use	0.8 µg/L 1.3 ml
Standard 6	White	Ready to use	1.6 µg/L 1.3 ml
Conjugate	Red	Ready to use	6 ml
Antibody	Black	Ready to use	6 ml
Substrate	Green	Ready to use	7 ml
Chromogen	Blue	Ready to use	7 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use	14 ml

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment

- grinder (mill)
- magnetic stirrer
- blender
- centrifuge or paper filter
- evaporator
- glas tubes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)

5.2. Reagents

- Methanol
- Acetonitrile
- PuriTox Trichothecene; Product code: TC-T220
- for dilution of samples (for dilutions > dilution factor of 35):
PBS buffer, pH 7.2: (0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl; fill up to 1000 ml with methanol/distilled water 10/90 (v/v)

This buffer has to contain 10 % methanol in order to keep a 10 % methanol concentration of the samples used in the assay (also see section 9.1./9.2.).

6. Warnings and precautions for the users

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

The standards contain T-2 toxin, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of the glassware and T-2 toxin solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 % (v/v)) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

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).

T-2 toxin is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

The colorless chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

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

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

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

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

9.1. Cereals: Measuring range 3.5 – 56 ppb (sample preparation with solid phase column: PuriTox Trichothecene; TC-T220)

- weigh 5 g of ground sample and add 20 ml acetonitrile/dist. water 84/16 (v/v)
- blend at high speed for 3 min
- centrifuge: 10 min / ≥ 3000 rpm / room temperature (20 - 25 °C / 68 – 77 °F)
- pass 6 ml of the supernatant through the PuriTox Trichothecene (TC-T220) column by applying pressure with a plunger and collect the cleaned-up filtrate in a glass tube; pass air through the column to remove residual liquid
- evaporate 4 ml of the cleaned-up filtrate to dryness under air at 60 - 70 °C
- dissolve the dried residue in 5 ml methanol/dist. water 70/30 (v/v)
- dilute the sample 1:7 (1+6) with sample buffer (see 4.), (e.g. 100 μ l sample + 600 μ l sample buffer)
- use 50 μ l per well in the assay

Note: The clean-up method was originally developed for GC analysis by R-Biopharm Rhone (see instruction for use TC-T220). The method described above for the ELISA analysis was modified by R-Biopharm.

Remark:

At high T-2 toxin concentrations (> 56 ppb), the 1:7 diluted extract solution must be further diluted e. g. 1:10 (1+9) with PBS buffer containing 10 % methanol (see 5.2.), e. g. 50 μ l of the diluted extract solution + 450 μ l PBS buffer with 10 % methanol.

9.2. Cereals and feed: Measuring range 35 – 560 ppb

- weigh 5 g of sample and dissolve with 25 ml of methanol/distilled water 70/30 (v/v) for extraction*)
- blend at high speed for 3 min
- filter the extract over paper filter or centrifuge the extract (10 min / ≥ 3000 rpm / room temperature (20 - 25 °C / 68 – 77 °F))
- dilute the filtrate or the supernatant 1:7 (1+6) with sample buffer (see 4.), e. g. 100 μ l of filtrate or supernatant + 600 μ l of sample buffer
- the diluted extract solution must be further diluted; e.g. 50 μ l diluted extract + 450 μ l PBS buffer containing 10 % methanol (see 5.2.)
- use 50 μ l per well in the assay

*) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/distilled water 70/30 (v/v) must be adapted accordingly, e.g.: 25 g in 125 ml methanol/distilled water 70/30 (v/v) or 50 g in 250 ml methanol/distilled water 70/30 (v/v)

Remark:

At high T-2 toxin concentrations (> 560 ppb), the 1:7 diluted extract solution must be further diluted e. g. 1:10 (1+9) with PBS buffer containing 10 % methanol (see 5.2.), e. g. 50 μ l of the diluted extract solution + 450 μ l PBS buffer with 10 % methanol.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

10.2. Test procedure

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.

2. Add 50 µl of standard or prepared sample to separate duplicate wells; use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of conjugate to each well.
4. Add 50 µl of the antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h 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 distilled water and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.
6. Add 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 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 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN® enzyme immunoassays.

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

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the T-2 toxin concentration [µg/kg].

In order to obtain the T-2 toxin concentration in µg/kg actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factors are as follows:

Cereals (9.1):	35 (or 350)
Ceraels, feed (9.2):	350 (or 3500)

Therefore, the standard curve is in the range of 3.5 to 56 µg/kg (ppb) T-2 toxin when using sample preparation 9.1. or in the range of 35 to 560 µg/kg (ppb) T-2 toxin when using sample preparation 9.2..

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