

RIDASCREEN[®] FAST Lysozym

Art. No. R6452

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Lysozym

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
lysozyme

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 Lysozym (Art. Nr.: R6452) Test ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Lysozym (Hühnerei-Protein) in Lebensmitteln wie Wein, Käse und Wurst.

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. 15 min
Testdurchführung (Inkubationszeit).....30 min

Nachweisgrenze: Wein 0,006 mg/kg (ppm) Lysozym
Käse, Wurst 0,016 mg/kg (ppm) Lysozym

Bestimmungsgrenze: Wein0,05 mg/kg (ppm) Lysozym
Käse, Wurst0,25 mg/kg (ppm) Lysozym

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch Lysozym aus Hühnerei.

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

bioavid Lateral Flow Ei/Egg (BL608-10)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Lysozym (Art. Nr. R6452) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Lysozym (Hühnerei-Protein) in Lebensmitteln wie Wein, Käse und Wurst.

2. Allgemeines

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Ei 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.

Lysozym wird auf Grund seiner bakteriostatischen Wirkung zur Konservierung sowohl bei der Weinherstellung als auch bei der Käse- und Wurstherstellung eingesetzt (E1105). Es gehört zu den allergenen Eiklarproteinen und ist zu 3,5 % im Eiklarprotein enthalten. Neben Ovalbumin, Ovomuroid und Ovotransferrin kann Lysozym bei entsprechenden Personen zu allergischen Reaktionen führen.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Lysozym beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Lysozym an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidasegekoppelten 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 Lysozym erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das 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 ist proportional zu der Lysozym Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Lysozym 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
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	0,05 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	0,1 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	0,2 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	0,4 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		6 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 20**, der sich aus der Probenvorbereitung von Wein ergibt. So können die Lysozym-Konzentrationen der Weinproben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Für Käse und Wurst ergibt sich ein **Verdünnungsfaktor von 100**. Die aus der Standardkurve abgelesenen Werte müssen zusätzlich mit Faktor 5 multipliziert werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Wasserbad 60 °C

- Papierfaltenfilter
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

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

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 Lysozym zu entfernen und Kontamination zu vermeiden.

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als **10fach Konzentrat** vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C vollständig lösen und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat **1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen** (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von vier Wochen bei 20 - 25 °C.

Für die Extraktion von Käse- und Wurst-Proben wird gesondert ein Hochsalz-Allergen Extraktionspuffer benötigt. Dazu werden 10 g NaCl zu 100 ml final verdünntem Allergen Extraktionspuffer hinzugefügt. Der Puffer hat dann eine Haltbarkeit von 4 Wochen bei 20 - 25 °C.

Eine repräsentative Probenmenge (5 - 50 g) sollte homogenisiert werden.

9.1. Käse und Wurst

- 1 g einer repräsentativen, homogenen Probe mit 20 ml Hochsalz-Allergen Extraktionspuffer (vortemperiert auf 60 °C) aufnehmen und mischen
- Proben 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- Proben auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) abkühlen lassen (z. B. im Eisbad)
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- Überstand 1:5 (1+4) mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer (ohne Salz-Zusatz) verdünnen
(**Anmerkung:** diesen verdünnten Überstand unmittelbar in den Test einsetzen bzw. nicht länger als 2 Stunden stehen lassen)
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

Falls weitere Verdünnungen notwendig sind, sollten diese mit einem Gemisch aus Allergen Extraktionspuffer / Hochsalz-Allergen Extraktionspuffer im Verhältnis 5:1 (4 ml + 1 ml) vorgenommen werden.

9.2. Wein

- 1 ml einer repräsentativen, homogenen Probe mit 19 ml Allergen Extraktionspuffer (vortemperiert auf 60 °C) aufnehmen und mischen
- Proben 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- Proben auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) abkühlen lassen (z. B. im Eisbad)
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

Für eine **niedrigere Bestimmungsgrenze** kann statt der 1:20 Verdünnung auch nur eine 1:10 Verdünnung durchgeführt werden. Zu 1 ml Weinprobe werden 9 ml Allergen Extraktionspuffer hinzugefügt. In der RIDA®SOFT Win muss dann ein Verdünnungsfaktor von 0,5 (anstelle von 1) eingetragen werden.

Bei Weinen mit hohem **Polyphenol-Anteil** (z.B. Rotwein) muss 0,25 % Casein (z.B. SIGMA, C5890) oder 0,25 % Gelatine (z.B. SIGMA, G-6144) zum final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugesetzt werden. Dazu z.B. 100 ml final verdünnten Allergen Extraktionspuffer mit 0,25 g Casein oder Gelatine versetzen und 10 min rühren. 1 ml Wein mit 19 ml verdünntem Allergen Extraktionspuffer mit Zusatz 10 min bei 60 °C extrahieren.

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage und bei -20 °C einige Monate haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Das Konzentrat muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von vier Wochen bei 20 - 25 °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 oder Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) 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.

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

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 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 saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen.
4. Je 100 µl 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 gefärbtes 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 des 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 Lysozym-Kontamination hinweisen.

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

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift für Wein gilt der Verdünnungsfaktor 20. Die Lysozym-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden - der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe 4.*).

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:20 (Aufarbeitung von Käse, Wurst) muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Lysozym-Konzentration berücksichtigt werden, d.h. im Fall von Käse und Wurst Faktor 5.

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.

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

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen
- Bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung sollten Spike Versuche durchgeführt werden.
- sollte eine Analyse mittels dem ChemWell® oder GEMINI Automaten erfolgen, wenden Sie sich bitte an R-Biopharm AG.

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

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. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®]FAST Lysozym

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Lysozym (Art. No.: R6452) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative determination of lysozyme (hen's egg protein) in food like wine, cheese and sausage.

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. 15 min
test implementation (incubation time) 30 min

Limit of detection: Wine0.006 mg/kg (ppm) lysozyme
Cheese, sausage0.016 mg/kg (ppm) lysozyme

Limit of quantification: Wine0.05 mg/kg (ppm) lysozyme
Cheese, sausage0.25 mg/kg (ppm) lysozyme

Specificity: The antibodies specifically detect lysozyme of hen's egg.

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.

Produktangebot

bioavid Lateral Ei / Egg (BL608-10)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Lysozym (Art. No.: R6452) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of lysozyme (hen's egg protein) in food like wine, cheese and sausage.

2. General

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**, egg and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Lysozyme is due to its bacteriostatic effect used for the preservation in wine production as well as in cheese and sausage products (E1105). It is one of the allergenic egg white proteins and is contained to 3.5 % in egg white protein. In addition to ovalbumin, ovomucoid and ovotransferrin lysozyme can lead to allergic reactions.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to Lysozyme. By adding standards and samples to the wells, any lysozyme 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 lysozyme 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 Lysozyme concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg lysozyme.

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
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	0.05 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	0.1 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	0.2 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	0.4 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Ready to use		6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

- *) **The dilution factor 20** which results after sample preparation of wine has already been considered for the standard concentrations. Therefore, the lysozyme concentrations of wine samples can directly be read from the standard curve.

In the case of cheese and sausage the **dilution factor 100** results. Therefore, the concentration read from the standard curve has to be multiplied additionally by factor 5.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

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

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water

6. Warnings and precautions for the users

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

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

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 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 lysozyme and to avoid contamination.

The **Allergen Extraction buffer** is available as a **10x concentrate**. 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 distilled water** before use (e.g. 100 ml of buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for four weeks.

For the extraction of cheese and sausage samples, a high-salt allergen extraction buffer is needed separately. For this 10 g NaCl is added to 100 ml Allergen Extraction buffer. The diluted buffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °F) for four weeks.

A representative amount of sample (5 - 50 g) should be homogenized.

9.1. Cheese and sausage

- add 1 g of a representative, homogeneous sample to 20 ml high-salt allergen extraction buffer (preheated to 60 °C / 140 °F) and mix
- incubate samples for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath
- cool samples to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) (e.g. in an ice bath)
- centrifuge: 10 min, at least 2500 g, if possible at 4 °C (39.2 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- dilute supernatant 1:5 (1+4) with finally diluted Allergen Extraction buffer (no salt added)
(**Note:** use this diluted supernatant directly or within 2 hours in the test)
- use 100 µl per well in the test

If further dilutions are necessary, they should be performed with a mixture of Allergen Extraction buffer / high-salt allergen extraction buffer in proportion 5:1 (4 ml + 1 ml).

9.2. Wine

- add 1 ml of a representative, homogeneous sample to 19 ml of Allergen Extraction buffer (preheated to 60 °C / 140 °F) and mix
- incubate samples for 10 min at 60 °C (140 °F) in a water bath
- cool samples to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) (e.g. in an ice bath)
- centrifuge: 10 min, at least 2500 g, if possible at 4 °C (39.2 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl per well in the test

To obtain a **lower limit of quantification** carry out a 1:10 dilution instead of a 1:20 dilution. To 1 ml of wine sample add 9 ml of Allergen Extraction Buffer. In the RIDA[®]SOFT Win a dilution factor of 0.5 (instead of 1) has to be taken into account.

When using wine with high **polyphenol content** (e.g. red wine) add 0.25 % casein (e.g. SIGMA, C5890) or 0.25 % gelatin (e.g. SIGMA, G-6144) to the diluted Allergen Extraction buffer. Add e.g. 0.25 g of casein or gelatin to 100 ml final diluted Allergen Extraction buffer and stir for 10 minutes. Add 19 ml of diluted allergen extraction buffer with additive to 1 ml of wine and extract for 10 min at 60°C.

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

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **Wash Buffer** is provided as a 10fold concentrate. Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted wash buuffer is stable at 20 - 25 °C (68 - 77 °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 or Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) 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.

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.

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 diluted wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
4. Add 100 µl of the 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 diluted 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 lysozyme 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 for wine, the dilution factor is 20. The allergen concentration can be read directly from the standard curve - the sample dilution factor of 20 is already taken into account for the standard concentrations (see 4. *).

For sample dilutions of more than 1:20 (sample preparation of cheese and sausage) the further dilution factor must be considered for the calculation of the

lysozyme concentration. In case of cheese and sausages the additional factor is 5.

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.

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

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- to analyze each sample material in duplicates
- to use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls
- in case of extremely acid or alkaline samples, the pH should be adjusted to a neutral pH
- to carry out spiking experiments for an accurate and correct procedure
- For details using the ChemWell® or GEMINI automation please contact R-Biopharm AG

The product information folder with further information 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