

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Ochratoxin A 30/15**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von  
Ochratoxin A

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of  
ochratoxin A

Art. No.: R1311

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-64297 Darmstadt  
[www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
[orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

RIDA® und RIDASCREEN®  
sind eingetragene Warenzeichen 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® Ochratoxin A 30/15 (Art. Nr.: R1311) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A in Getreide, Futtermitteln, Bier und Schweineserum.

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

Der Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:            Getreide und Futtermittel: extrahieren, zentrifugieren oder filtrieren  
  Bier und Schweineserum: extrahieren, zentrifugieren, filtrieren, ausschütteln, ein zweites Mal extrahieren, zentrifugieren und evaporieren

Zeitbedarf:                        Probenvorbereitung (für 10 Proben)  
  Getreide und Futtermittel ..... ca. 0,5 h  
  Bier und Schweineserum ..... ca. 2,5 h  
  Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 45 min

Nachweisgrenze:                Getreide und Futtermittel (9.1.)..... 2,5 ppb  
  Getreide und Futtermittel (9.2.)..... 1,25 ppb  
  Bier und Schweineserum ..... ca. 50 ppt

Wiederfindungsrate:            in Getreide und Futtermittel ..... ca. 100 %  
  in Bier und Schweineserum ..... ca. 100 %

Spezifität:                        Die Spezifität des RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen ermittelt.  
  Ochratoxin A ..... 100 %  
  Ochratoxin C ..... 44 %  
  Ochratoxin B ..... 14 %  
  Ochratoxin  $\alpha$  ..... < 0,1 %

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Ochratoxin A in Getreide, Futtermitteln, Bier und Schweineserum.

## 2. Allgemeines

Das Mykotoxin Ochratoxin A wird von Pilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* gebildet. Neben der ausgeprägten Nephrotoxizität weist Ochratoxin A hepatotoxische, teratogene, kanzerogene und immunsuppressive Eigenschaften auf. Eine Gesundheitsgefährdung des Menschen besteht nicht nur über die Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft, sondern auch über Lebensmittel tierischer Herkunft. So wurde Ochratoxin A in Schweineblut und -nieren sowie in Menschenblut und Muttermilch nachgewiesen.

## 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antikörpern gegen Ochratoxin A beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probenlösungen sowie enzymmarkiertes Ochratoxin A (Enzymkonjugat). Freies und enzymmarkiertes Ochratoxin A konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes enzymmarkiertes Ochratoxin A wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt.

Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Ochratoxin A-Konzentration in der Probe.

## 4. Packungsinhalt

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

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten)  
beschichtet mit Antikörpern gegen Ochratoxin A
- 6 x Standardlösungen (je 1,3 ml)  
0 ppt (Nullstandard), 50 ppt, 100 ppt, 300 ppt, 900 ppt, 1800 ppt  
Ochratoxin A in wässriger Lösung
- 1 x Konjugat (0,7 ml) .....roter Verschluss  
Peroxidase-konjugiertes Ochratoxin A  
Konzentrat
- 1 x Substrat/Chromogen (10 ml) .....brauner Verschluss  
enthält Tetramethylbenzidin, rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) ..... gelber Verschluss  
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffer (7 ml)..... weißer Verschluss  
Konjugat-Verdünnungspuffer
- 1 x Waschpuffer (Salz)  
zur Herstellung eines 10 mM Phosphatpuffers, pH 7,4  
enthält 0,05 % Tween 20

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Rotationsverdampfer oder andere Abdampfvorrichtung
- Schüttler
- Labor- oder Getreidemühle
- Magnetrührer
- Trichter und Filterpapier
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

## 5.2. Reagenzien:

- 1 N HCl
- Dichlormethan
- 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (NaHCO<sub>3</sub>), pH 8,1 stellt sich ein

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die Standards enthalten Ochratoxin A, 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).

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

## 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.

Ochratoxin A ist lichtempfindlich, deshalb die Ochratoxin A-Standards vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Die Substrat-/Chromogenlösung 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 der rötlichen Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

### 9.1. Getreide und Futtermittel

#### ***Probenvorbereitung für ein schnelles und einfaches Screening (Nachweisgrenze: 2,5 ppb)***

Eine repräsentative Probe mit einer Labormühle zerkleinern oder zermahlen und gut durchmischen.

- 5 g zerkleinertes Getreide mit 100 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer (siehe 5.2.) mischen
- 15 min schütteln
- den Extrakt durch einen Papierfaltenfilter filtrieren oder alternativ zentrifugieren: 15 min / 3500 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

### 9.2. Getreide und Futtermittel

#### ***Probenvorbereitung für ein sensitiveres Screening (Nachweisgrenze: 1,25 ppb)***

Eine repräsentative Probe mit einer Labormühle zerkleinern oder zermahlen und gut durchmischen.

- 2 g Probe in ein verschraubbares Zentrifugengefäß einwiegen
- 5 ml 1 N HCl hinzufügen und 5 min rühren/schütteln
- mit 10 ml Dichlormethan versetzen und 15 min schütteln (horizontale Lage des Schraubglases ist zu empfehlen)
- zentrifugieren: 15 min / 3500 g / 15 °C
- die obere, wässrige Phase vollständig bis zum Probenkuchen absaugen und verwerfen
- den Probenkuchen und die untere Dichlormethanphase über einen Papierfilter geben und die Dichlormethanphase in einem verschraubbaren Zentrifugengefäß auffangen
- zu dem Filtrat das gleiche Volumen 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (siehe 5.2.) hinzufügen und 15 min ausschütteln
- zentrifugieren: 15 min / 3500 g / 15 °C
- 100 µl der oberen wässrigen Phase mit 400 µl 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (siehe 5.2.) verdünnen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

### 9.3. Bier und Schweineserum

- Serum zentrifugieren
- Bier rühren oder über einen Papierfilter geben (zur CO<sub>2</sub>-Entfernung)
- 2 ml Probe mit 2,5 ml 1 N HCl und 4 ml Dichlormethan versetzen (in einem verschraubbaren Zentrifugengefäß)
- 5 min rühren/schütteln
- zentrifugieren: 15 min / 3500 g / 15 °C
- die obere, wässrige Phase absaugen und verwerfen
- den Probenkuchen und die untere Dichlormethanphase über einen Papierfilter geben und die Dichlormethanphase auffangen
- 2 ml der klaren Dichlormethanphase in ein verschraubbares Zentrifugengefäß überführen
- die Dichlormethanphase mit 2 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (siehe 5.2.) 5 min ausschütteln
- zentrifugieren: 5 min / 3500 g / 15 °C
- die obere NaHCO<sub>3</sub>-Phase abnehmen
- das Ausschütteln und die anschließende Zentrifugation wiederholen
- beide NaHCO<sub>3</sub>-Phasen vereinigen und mit 0,75 ml 1 N HCl und 2 ml Dichlormethan versetzen
- 10 min gut mischen (Schüttler)
- zentrifugieren: 5 min / 3500 g / 15 °C
- die obere, wässrige Phase absaugen und die Dichlormethanphase bei 60 °C vollständig evaporieren (möglichst unter schwachem N<sub>2</sub>-Strom unter dem Abzug)
- den Rückstand in 1 ml 0,13 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (siehe 5.2.) lösen
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

#### **Anmerkung:**

#### **Auf Anfrage sind diese weiteren Applikationen erhältlich:**

- **für Gewebe (Leber und Niere)**
- **in Kombination mit RIDA<sup>®</sup> Ochratoxin A column (R1303) für Rohkaffee und Röstkaffee, für Trockenfrüchte und für Wein**
- **in Kombination mit OCHRAPREP<sup>®</sup> Immunaффinitätssäule (RBRP14 / RBRP14B) für Paprika**



## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

**Das Ochratoxin A-Enzymkonjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat mit Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Konjugat-Verdünnungspuffer (siehe 4.) verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen. Die Lösung (10fach Konzentrat) ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

### 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 der Standardlösung bzw. der nach Abschnitt 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren,
3. Je 50 µl verdünnte Enzymkonjugat-Lösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
4. 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.

5. Je 100 µl Substrat/Chromogenlösung in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min (+/- 1 min) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), 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 Ochratoxin A-Konzentration [ng/kg] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Ochratoxin A-Konzentration in ng/kg (ppt) bzw. µg/kg (ppb) zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Getreide und Futtermittel (9.1.) .....	20
Getreide und Futtermittel (9.2.) .....	25
Bier und Schweineserum .....	1

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<sup>®</sup> Ochratoxin A 30/15

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Ochratoxin A 30/15 (Art. No.: R1311) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in cereals, feed, beer and pig serum.

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:	cereals and feed: extraction, centrifugation or filtration beer and pig serum: extraction, centrifugation, filtration, shaking, second extraction, centrifugation and evaporation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) cereals and feed ..... approx. 0.5 h beer and pig serum ..... approx. 2.5 h test implementation (incubation time) ..... 45 min
Detection limit:	cereals and feed (9.1.) ..... 2.5 ppb cereals and feed (9.2.) ..... 1.25 ppb beer and pig serum: ..... approx. 50 ppt
Recovery rate:	in cereals and feed ..... approx. 100 % in beer and pig serum ..... approx. 100 %
Specificity:	The specificity of the RIDASCREEN <sup>®</sup> Ochratoxin A 30/15 was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins.  Ochratoxin A ..... 100 % Ochratoxin C ..... 44 % Ochratoxin B ..... 14 % Ochratoxin $\alpha$ ..... < 0.1 %

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of ochratoxin A in cereals, feed, beer and pig serum.

## 2. General

The mycotoxin ochratoxin A is formed by fungi of the species *Aspergillus* and *Penicillium*. Apart from a marked nephrotoxicity, ochratoxin A displays hepatotoxic, teratogenic, carcinogenic and immunosuppressive properties.

There is a risk to human health not only through the intake of contaminated foods of vegetable origin, but also through foods of animal origin. Ochratoxin A was detected in pig blood and kidneys, as well as in human blood and mother's milk.

## 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells in the microtiter strips are coated with specific antibodies against Ochratoxin A. Ochratoxin A standards or the sample solutions and enzyme conjugate are added. Free and enzyme conjugated ochratoxin A compete for the ochratoxin A antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is 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 absorption is inversely proportional to the ochratoxin A concentration in the sample.

#### 4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate with 96 wells (12 strips with 8 wells each)  
coated with antibodies against ochratoxin A
- 6 x Ochratoxin A standard solutions (1.3 ml each)  
0 ppt (zero standard), 50 ppt, 100 ppt, 300 ppt, 900 ppt, 1800 ppt  
ochratoxin A in aqueous solution
- 1 x Conjugate (0.7 ml) .....red cap  
peroxidase conjugated ochratoxin A  
concentrate
- 1 x Substrate/chromogen (10 ml) ..... brown cap  
contains tetramethylbenzidine, stained red
- 1 x Stop solution (14 ml) .....yellow cap  
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer (7 ml)..... white cap  
conjugate dilution buffer
- 1 x Wash buffer (salt)  
for preparation of a 10 mM phosphate buffer, pH 7.4  
contains 0.05 % tween 20

#### 5. Materials required but not provided

##### 5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge
- rotary evaporator or another equipment for evaporation of solvents
- shaker
- grinder (mill)
- magnetic stirrer
- funnel and paper filter
- pasteur pipettes
- graduated pipettes
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

## 5.2. Reagents:

- 1 N HCl (hydrochloric acid)
- dichloromethane (methylenechloride, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)
- 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer (NaHCO<sub>3</sub>), pH 8.1 is reached

## 6. Warnings and precautions for the users

The standard solutions contain ochratoxin A, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

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

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

## 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).

Ochratoxin A is light-sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

The substrate/chromogen solution 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 reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) for the zero standard

## 9. Preparation of Samples

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

### 9.1. Cereals and feed

#### ***Sample preparation for a rapid and easy screening (limit of detection: 2.5 ppb)***

A representative sample is triturated and thoroughly mixed in a mixer.

- weigh 5 g of ground sample and add it to a suitable container with 100 ml of 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer (see 5.2.)
- shake vigorously for 15 min with a shaker
- filter the extract through a paper filter or centrifuge alternatively:  
15 min / 3500 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 50 µl per well in the assay

### 9.2. Cereals and feed

#### ***Sample preparation for a more sensitive screening (limit of detection: 1.25 ppb)***

A representative sample is triturated and thoroughly mixed in a mixer.

- weigh 2 g of the ground sample into a centrifugal screw cap vial
- add 5 ml of 1 N HCl and shake for 5 min
- add 10 ml of dichlormethane and shake vigorously for 15 min (horizontal position of the vials is recommended)
- centrifuge: 15 min / 3500 g / 15 °C (59 °F)
- remove upper aqueous layer completely up to the sample cake and discard it
- filter entire dichlormethane layer by using a paper filter to separate the sample cake and collect the filtered dichlormethane in a new centrifugal screw cap vial
- add the equivalent volume of 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer (see 5.2.) and shake vigorously for 15 min
- centrifuge: 15 min / 3500 g / 15 °C (59 °F)
- dilute 100 µl of the upper aqueous phase with 400 µl of 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer (see 5.2.)
- use 50 µl per well in the assay

### 9.3. Beer and pig serum

- centrifuge serum
- stir beer or filter through paper filter to remove excessive CO<sub>2</sub>
  
- dilute 2 ml of the sample with 2.5 ml of 1 N HCl and 4 ml of dichlormethane (in a centrifugal, screw cap vial)
- shake for 5 min
- centrifuge: 15 min / 3500 g / 15 °C (59 °F)
- remove upper aqueous layer and discard it
- filter entire dichlormethane layer by using a paper filter to separate the sample cake and collect the filtered dichlormethane in a new centrifugal screw cap vial
- 2 ml of the clear dichlormethane layer are transferred into another centrifugal screw cap vial
- extract the dichlormethane layer with 2 ml of 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer (see 5.2.) by shaking for 5 min
- centrifuge: 5 min / 3500 g / 15 °C (59 °F)
- collect the upper sodium hydrogen carbonate layer
- repeat extraction and centrifugation
- combine both NaHCO<sub>3</sub> phases and dilute the solution with 0.75 ml of 1 N HCl and 2 ml of dichlormethane
- mix thoroughly for 10 min (shaker)
- centrifuge: 5 min / 3500 g / 15 °C (59 °F)
- remove upper aqueous layer, use entire dichlormethane layer and evaporate to complete dryness at 60 °C (140 °F), if possible by means of a weak nitrogen stream
- redissolve the residue in 1 ml of 0.13 M sodium hydrogen carbonate buffer (see 5.2.)
- use 50 µl per well in the assay

#### **Remark:**

**These further application notes are available on request, please contact your local distributor:**

- **for tissue (liver and kidney)**
- **in combination with RIDA<sup>®</sup> Ochratoxin A column (R1303) for green coffee and roasted coffee, for dried fruits and for wine**
- **in combination with OCHRAPREP<sup>®</sup> immunoaffinity column (RBRP14 / RBRP14B) for paprika**



## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

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

The **ochratoxin A enzyme conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate. Since the diluted enzyme conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in conjugate dilution buffer (see 4., e. g. 200 µl concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

As **washing buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use washing buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the pouch in 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated washing buffer. Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use washing buffer.

The 10fold concentrate expires after approx. 8 - 12 weeks, store at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

### 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 microtiter 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 the standard solutions or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the diluted enzyme conjugate 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.
4. 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat the washing procedure two times.

5. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min (+/- 1 min) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
6. 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 RIDA<sup>®</sup>SOFT Win (Art. No. Z9999), is available to evaluate the RIDASCREEN<sup>®</sup> 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 ochratoxin A concentration [ng/kg].

In order to obtain the ochratoxin A concentration in ng/kg (ppt) or µg/kg (ppb) 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 and feed (9.1.) .....	20
cereals and feed (9.2.) .....	25
beer and pig serum .....	1

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. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. 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.