

RIDASCREEN[®] FAST Ei / Egg Protein

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Volleipulver

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
whole egg powder

Art. No.: R6402

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

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

Marketing / Vertrieb:

(0 61 51) 81 02-40
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®FAST Ei / Egg Protein (Art. Nr.: R6402) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Volleipulver 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 benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 20 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min
Standardmaterial:	NIST Referenzmaterial 8445 (Volleipulver)
Nachweisgrenze:	0,10 mg/kg (ppm) Volleipulver (entspricht 0,03 mg/kg (ppm) Eiklar-Protein)
Bestimmungsgrenze:	0,5 mg/kg (ppm) Volleipulver (entspricht 0,13 mg/kg (ppm) Eiklar-Protein)
Spezifität:	Die spezifischen Antikörper erfassen die Eiklar-Proteine Ovalbumin und Ovomuroid. Es besteht keine Kreuzreaktivität zu rohem oder gekochtem Hühner-, Puten-, Schweine- oder Rindfleisch.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Volleipulver in Lebensmitteln wie Nudeln, Salatdressings, Wurst, Wein, Kuchen- oder Brot-Backmischungen und Eiscreme.

2. Allgemeines

Ei kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **EU Richtlinie 2003/89/EG** vom 10. November 2003 muss Ei als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein.

Eiklar enthält 9 - 11 % Protein. Allergologisch von Bedeutung sind vier Hauptallergene, die 80 % des Eiklar-Proteingehaltes ausmachen. Zu den Hauptallergenen zählen Ovomukoid (11 %), Ovalbumin (54 %), Ovotransferrin (12 %) und Lysozym (3,5 %). Die Proteine im Eidotter weisen hingegen nur mäßige Allergenität auf.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Eiklar-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Eiklar-Protein an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift 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 Eiklar-Protein erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das 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 ist proportional zu der Eiklar-Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Volleipulver angegeben.

4. Packungsinhalt

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

- 1 x Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten (6 Streifen à 8 Einzelkavitäten)
beschichtet mit anti-Eiklar-Protein-Antikörpern
- 5 x Standardlösungen *) (je 1,3 ml)
0 mg/kg (Nullstandard), 0,5 mg/kg, 1,5 mg/kg, 4,5 mg/kg, 13,5 mg/kg
Volleipulver in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugierter Antikörper, 11fach Konzentrat
- 1 x Substrat-/Chromogenlösung (10 ml)brauner Verschluss
rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Allergen Extraktionspuffer (125 ml)grüner Verschluss
als **10fach Konzentrat**
- 1 x Waschpuffer (100 ml)brauner Verschluss
als 10fach Konzentrat

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können die Volleipulver-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzgläser
- Schüttler
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- 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.

Der Waschpuffer enthält Thimerosal. Hautkontakt unbedingt vermeiden.

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.

Die rötlich gefärbte 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 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 5

9. Probenvorbereitung

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

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor der Verdünnung des Konzentrats 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, oder alternativ den gesamten Flascheninhalt mit dest. Wasser auf 1250 ml auffüllen). Der verdünnte Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. zwölf Wochen bei 2 - 8 °C.

- 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen
- davon 1 g einwiegen und mit 20 ml verdünntem Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte schon eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- bzw. bei flüssigen Proben 1 ml Probe mit 19 ml verdünntem Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte schon eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C inkubieren, anschließend abkühlen
- 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 in den Test einsetzen

Anmerkung:

Bei Nelken-, Senf- oder Sellerie-enthaltenden Proben, 1 g Casein zu 1 g bzw. 1 ml Probe zusetzen, um Störeffekte zu vermeiden.

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

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

Das **Antikörper-Enzymkonjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat mit dest. Wasser 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 dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 200 µl Konzentrat + 2 ml dest. Wasser ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor der Verdünnung des Konzentrats 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 Waschpuffer hat eine Haltbarkeit von ca. 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.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl der Standardlösung bzw. der vorbereiteten Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünnte Enzymkonjugat-Lösung (siehe 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat-/Chromogenlösung in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 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. 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 Ei-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450 \text{ nm}}$) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen. Die Proben sollten so weit verdünnt werden, dass sie im linearen Teil der Kurve abgelesen werden können.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Probenvorbereitung gilt der Verdünnungsfaktor 20. Die Volleipulver-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 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Volleipulver-Konzentrationen mit berücksichtigt werden.

Der Test ist kalibriert gegen das NIST Referenzmaterial 8445 (Volleipulver). Das Ergebnis wird als mg/kg Volleipulver ausgedrückt. Das Referenzmaterial 8445 enthält 49 % Gesamtprotein. Wird das Ergebnis mit 0,49 multipliziert, erhält man mg/kg (ppm) Gesamtprotein. Multipliziert man das Ergebnis mit 0,263 erhält man mg/kg (ppm) Eiklar-Protein.

Rechenbeispiel:

Aus der Kurve wurden 10 mg/kg Volleipulver abgelesen. Multipliziert man mit 0,49, erhält man 4,9 mg/kg (ppm) Gesamtprotein bzw. mit 0,263, erhält man 2,63 mg/kg (ppm) Eiklarprotein.

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- ei-freie und ei-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen

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 Ei / Egg Protein

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Ei / Egg Protein (Art. No. R6402) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of whole egg powder 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. 20 min test implementation (incubation time)..... 30 min
Standard material:	NIST Reference Material 8445 (whole egg powder)
Limit of detection:	0.10 mg/kg (ppm) whole egg powder (corresponds to 0.03 mg/kg (ppm) egg white protein)
Limit of quantification:	0.5 mg/kg (ppm) whole egg powder (corresponds to 0.13 mg/kg (ppm) egg white protein)
Specificity:	The specific antibodies detect from the egg white proteins ovalbumin and ovomucoid. No cross reactivity was observed to raw or cooked meat of chicken, turkey hen, pork and beef.

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of whole egg powder in food like noodles, salad dressings, sausages, wines, baking-mixtures for cakes or bread and ice cream.

2. General

Egg can be present as an ingredient or as a contamination in raw and cooked products. According to the **EU Directive 2003/89/EG** from 10th November 2003, egg must be declared on food labels as it can induce allergic reactions.

Egg white contains 9 - 11 % of protein. Four main allergenic proteins come to 80 % of the egg white proteins. These main allergens are ovomucoid (11 %), ovalbumin (54 %), ovotransferrin (12 %) and lysozyme (3.5 %). The allergenic potential of the proteins present in egg yolk is only moderate.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to egg white proteins. By adding standards and samples to the wells, any egg white 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 egg white protein takes place by adding Substrate/Chromogen solution. 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 egg white proteins concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg whole egg powder.

4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate with 48 wells (6 strips with 8 removable wells each)
coated with antibodies against egg white proteins
- 5 x Standard solutions *) (1.3 ml each)
0 mg/kg (zero standard), 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg, 4.5 mg/kg, 13.5 mg/kg whole
egg powder in aqueous solution, ready to use

- 1 x Conjugate (0.7 ml)red cap
peroxidase conjugated antibody, 11fold concentrate
- 1 x Substrate/Chromogen solution (10 ml)..... brown cap
stained red
- 1 x Stop solution (14 ml).....yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Allergen Extraction buffer (125 ml)green cap
as a **10fold concentrate**
- 1 x Washing buffer (100 ml) brown cap
as a 10fold concentrate

*) The **dilution factor of 20** for the sample has already been taken into account. Therefore, the whole egg powder concentration of samples can directly be read from the standard curve.

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal glass vials
- shaker
- water bath
- laboratory mincer/grinder, mortar, ultra-turrax or homogenizer
- graduated pipettes
- 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.

The washing buffer contains thimerosal. Avoid skin contact.

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).

The reddish 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 red stained substrate-/chromogen solution 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 egg and to avoid contamination.

The **Allergen Extraction buffer** is provided as a 10fold 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 (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water, or alternatively use the whole content of the bottle and fill up to 1250 ml). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. twelve weeks.

- grind 5 g of the sample carefully and mix thoroughly
- weigh 1 g of the sample and add 20 ml diluted Allergen Extraction buffer (the extraction buffer should already have a temperature of approx. 60 °C (140 °F))
- or add 19 ml of the diluted Allergen Extraction buffer to 1 ml liquid sample (the extraction buffer should already have a temperature of approx. 60 °C (140 °F))
- mix intensively and incubate for 10 min at 60 °C (140 °F), afterwards cool down
- centrifuge: 10 min, at least 2500 g, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- use 100 µl per well in the assay

Remark:

For cloves, mustard or celery containing samples, add 1 g casein to 1 g or 1ml sample to avoid disturbing effects.

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

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

The **antibody enzyme conjugate** (bottle with red cap) is provided as an 11fold concentrate. Since the diluted enzyme conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before diluting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in distilled water (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml distilled water, sufficient for 2 microtiter strips).

The **washing buffer** is provided as a 10fold 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 (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted washing buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. 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.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard solution or prepared sample to the wells, mix gently by shaking the plate manually 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 plate 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 two more times.

4. Add 100 µl of the diluted enzyme conjugate solution (see 10.1.) 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 plate 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 two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen solution 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 min after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), 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 egg contamination.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5. The samples should be diluted so that the results can be read in the linear part of the calibration curve.

Please note:

When working according to the described sample preparation, the dilution factor is 20. The whole egg powder 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. *)).

Sample dilutions of more than 1:20 must be considered for the calculation of the whole egg powder concentration.

The test is calibrated against NIST Reference Material 8445 (whole egg powder). The result is expressed as mg/kg whole egg powder. The reference material 8445

contains 49 % total protein. If the result is multiplied by 0.49, then the result can be expressed as mg/kg (ppm) total protein. If the result is multiplied by 0.263 then mg/kg (ppm) egg white protein are obtained.

Calculation example

From the standard curve 10 mg/kg whole egg powder are read. If multiplied by 0.49 then 4.9 mg/kg (ppm) whole egg protein is obtained. If multiplied by 0.263 then 2.63 mg/kg (ppm) egg white protein is obtained.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

- each sample material should be analyzed in duplicates
- egg free and egg containing (spiked) samples should be run as test controls

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.