

RIDASCREEN[®] FAST Lysozym

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Lysozym

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
lysozyme

Art. No.: R6452

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

(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 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 0,02 mg/kg (ppm) Lysozym
Käse, Wurst 0,10 mg/kg (ppm) Lysozym

Bestimmungsgrenze: Wein 0,05 mg/kg (ppm) Lysozym
Käse, Wurst 0,25 mg/kg (ppm) Lysozym

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch Lysozym aus Hühnerei.

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

Lysozym wird auf Grund seiner bakteriostatischen Wirkung zur Konservierung von Lebensmitteln 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. Im Rahmen der europäischen Allergen-Verordnung muss Ei in Lebensmitteln deklariert werden.

Lysozym wird als Konservierungsmittel sowohl bei der Weinherstellung als auch bei der Käse- und Wurstherstellung eingesetzt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Lysozym beschichtet. Bei Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Lysozym an die spezifischen Antikörper. Das Resultat ist ein Antikörper-Antigen-Komplex.

Die nicht gebundenen Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers (Enzymkonjugat). Dieses Konjugat bindet an den Antikörper-Antigen-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich).

Nach anschließender Auswaschung überschüssiger Reagenzien erfolgt der Nachweis durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das an den Antikörper gebundene Enzym 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 Lysozym-Konzentration in der Probe.

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-Lysozym-Antikörpern
- 5 x Lysozym Standards ^{*}), je 1,3 ml
0 ppm (Nullstandard), 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,4 ppm Lysozym
in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (7 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugierte Antikörper, gebrauchsfertig
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml)brauner Verschluss
Substrat-/Chromogenlösung, 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 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)
- Zentrifugengläser
- Wasserbad 60 °C
- Papierfaltenfilter
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

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

9. Probenvorbereitung

9.1. Vorbereitungen

Unsaubere Laborausrüstung kann zu einer Kontamination von Proben oder Testkomponenten mit Lysozym führen. Daher sollten während der Testdurchführung Handschuhe getragen und vor Beginn des Testes folgendes beachtet werden:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung sorgfältig reinigen
- Probenaufarbeitung und ELISA- Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen

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, 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.

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.

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

9.2. Probenextraktion

9.2.1. 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.

9.2.2. 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

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.

Der Extrakt ist 2 Tage bei 4 °C oder mehrere Monate portioniert bei -20 °C 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 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 in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.

2. Je 100 µl der Standardlösung 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 Enzymkonjugat-Lösung zu allen Kavitäten geben, vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang dreimal wiederholen.
6. Je 100 µl rot gefärbte Substrat-/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 Lysozym-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 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.

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- Lysozym-freie und Lysozym-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 Lysozym

Brief information

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.

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..... approx. 15 min
test implementation (incubation time)..... 30 min

Limit of detection: Wine 0.02 mg/kg (ppm) lysozyme
Cheese, sausage..... 0.10 mg/kg (ppm) lysozyme

Limit of quantification: Wine 0.05 mg/kg (ppm) lysozyme
Cheese, sausage..... 0.25 mg/kg (ppm) lysozyme

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

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

Lysozyme is due to its bacteriostatic effect used for the preservation of food 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 people to allergic reactions. Under the European Allergen Regulation egg has to be declared in food.

Lysozyme is used as a preservative in wine production as well as in cheese and sausage production.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies against lysozyme. By adding the standard or sample solution to the wells, present lysozyme will bind to the specific antibodies. The result is an antibody-antigen-complex.

In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase (enzyme conjugate) is added. This antibody conjugate is bound to the antibody-antigen-complex. An antibody-antigen-antibody-complex (sandwich) is formed.

Substrate/chromogen is added after removing of any unbound enzyme conjugate in a washing step. 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 proportional to the lysozyme concentration in the sample.

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 anti-lysozyme antibodies
- 5 x Standards ^{*)}, 1.3 ml each
0 ppm (zero standard), 0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.2 ppm, 0.4 ppm lysozyme
in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (7 ml)red cap
peroxidase conjugated antibody, ready to use
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) brown cap
substrate/chromogen, 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 Wash buffer (100 ml) brown cap
as a 10fold concentrate

*) **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)
- centrifugal vials
- water bath (60 °C / 140 °F)
- fluted paper filter
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

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 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

9.1. Preparations

Improper laboratory equipment can result in contamination of samples or test components with lysozyme. Therefore, gloves should be worn during the test procedure, and before the start of the test note the following:

- thoroughly clean surfaces, glassware, grinders and other equipment
- carry out sample preparation and ELISA assay in separate rooms

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, or alternatively fill up the entire contents of the bottle with dist. water to 1250 ml). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. twelve 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 buffer can be used for 4 weeks.

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

9.2. Sample extraction

9.2.1. 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 in the test or the diluted extract should be used within 2 hours)
- 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).

9.2.2. 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

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 extract can be stored 2 days at 4 °C (39.2 °F) or in small portions several months at - 20 °C (- 4 °F).

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **Washing 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 buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for four weeks.

10.2. Test procedure

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

Do not use more than three 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 in duplicate. Record standard and sample positions.

2. Add 100 µl of each standard solution 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
4. Add 100 µl of the enzyme 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
6. Add 100 µl of the reddish 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 minutes 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 lysozyme 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 in accordance with the regulation stated for wine, the dilution factor is 20. The lysozyme 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.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

- each sample material should be analyzed in duplicates
- use also lysozyme free and lysozyme containing (spiked) samples 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.