

RIDASCREEN[®] FAST Milk

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Milchprotein

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
milk protein

Art. No.: R4652

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 Milk (Art. Nr.: R4652) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Milchprotein 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 wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt.

Probenvorbereitung: homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben).....ca. 45 min
 Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min

Nachweisgrenze: 0,7 mg/kg (ppm) Milchprotein

Bestimmungsgrenze: 2,5 mg/kg (ppm) Milchprotein

Standardmaterial: Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist auf das Referenzmaterial NIST RM 1549 Magermilchpulver kalibriert.

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch die α -, β - und κ -Caseine sowie β -Lactoglobulin der Kuhmilch sowie der Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Milk ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Milchprotein in Lebensmitteln, die Molke, Milch oder Milchpulver enthalten können, wie Wurst, Eis, Schokolade, Backwaren, Backmischungen, Suppen, Saucen, Dressing und Getränken (Saft, Wein, Bier).

2. Allgemeines

Kuhmilch enthält ca. 3,2 % Protein, das zu 10 % aus β -Lactoglobulin (Leitprotein der Molke) und zu 80 % aus Caseinen besteht. Als Allergen ist das β -Lactoglobulin (vor allem für Kinder) von größter Bedeutung, während beim Erwachsenen eher das Casein als Allergen zu dominieren scheint.

Casein (lat. Caseus = Käse) ist ein grobflockig gerinnendes Protein, das in der Milch Mizellen bildet und beim Ansäuern der Milch ausfällt. Die Gruppe der Caseine besteht aus den α_s -Caseinen, den β -Caseinen, dem κ -Casein und den γ -Caseinen (proteolytisches Proteinfragment des β -Caseins durch die milcheigene Protease Plasmin). Durch Proteolyse (z.B. Einsatz von Labferment) entsteht aus κ -Casein eine hydrophobe (para κ -Casein) und eine wasserlösliche polare Komponente (Makropeptid).

Hauptkomponente der Molke sind β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin neben Lactoferrin, bovinem Serum Albumin und den Immunglobulinen.

Milch kann als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Da Milch schon im Säuglingsalter allergische Reaktionen hervorrufen kann, muss sie als Inhaltsstoff auf Lebensmitteletiketten angegeben werden. Lebensmitteln wird oft gezielt Molke (β -Lactoglobulin) oder Caseinat (z.B. in Wurstwaren) zugesetzt. Deshalb empfiehlt es sich, Lebensmittel auf Milchproteine zu untersuchen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen die Milchproteine Casein und β -Lactoglobulin beschichtet. Bei Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Milchprotein 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 Milchprotein-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-Casein- und anti- β -Lactoglobulin-Antikörpern
- 5 x Milchprotein Standards ^{*)}, je 1,3 ml
0 ppm (Nullstandard), 2,5 ppm, 7,5 ppm, 22,5 ppm, 67,5 ppm Milchprotein
in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugierte Antikörper, Konzentrat
- 1 x Konjugatverdünnungspuffer (7 ml)schwarzer Verschluss
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 Extraktions-Lösung 2 (110 ml)..... blauer Verschluss
als 2fach Konzentrat
- 1 x Waschpuffer (100 ml)brauner Verschluss
als 10fach Konzentrat
- 1 x Additive 1 (2 g)..... blauer Verschluss

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 100**, der sich aus der normalen Probenvorbereitung ergibt. So können die Milchprotein-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifugengläser
- Wasserbad 60 °C und 100 °C
- Papierfaltenfilter
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- destilliertes Wasser
- 1 M Salzsäure (HCl)
- 1 M Natronlauge (NaOH)

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).

Die Extraktions-Lösung 2 enthält β -Mercaptoethanol. Es wird empfohlen, unter einem Abzug zu arbeiten.

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

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

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als **10fach Konzentrat** vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen lösen (Wasserbad 37 °C) und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z.B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser) oder den gesamten Flascheninhalt auf 1250 ml auffüllen. Der verdünnte Allergen Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

Um den finalen **Allergen Extraktionspuffer mit Zusatz von Additive 1 (A-AEP)** herzustellen, müssen 1,8 g Additive 1 in ein Becherglas eingewogen und mit 20 ml 1 M NaOH gelöst werden. Rühren bis sich das Additive 1 gelöst hat. Dann 900 ml verdünnten Allergen Extraktionspuffer (s.o.) in einen Messzylinder geben. Unter konstantem Rühren die 20 ml Additive 1-Lösung dazugeben, evtl. Reste der Additive 1-Lösung mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer aufnehmen und in den Messzylinder überführen. Den mit Additive 1 versetzten Allergen Extraktionspuffer (A-AEP) mit 1 M HCl auf pH 9 einstellen und mit verdünntem Allergen Extraktionspuffer auf 1 L auffüllen.

1 L A-AEP reicht für ca. 60 Proben. Der Puffer ist ca. 3 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar oder ca. 8 Wochen bei 2 - 8 °C (sobald Kristalle ausfallen, muss der Puffer verworfen werden).

Die **Extraktions-Lösung 2** liegt als 2fach Konzentrat vor und muss 1:2 (1+1) mit dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 50 ml Extraktions-Lösung 2 + 50 ml dest. Wasser). Die komplett verdünnte Extraktions-Lösung 2 ist ausreichend für 55 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C).

9.2. Probenextraktion

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren

festе Proben:

- 1 g abnehmen und mit 4 ml final verdünnter Extraktions-Lösung 2 (siehe 9.1.) versetzen, gut mischen und verschließen, für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- auf die gekochte Probe 16 ml erwärmten (60 °C) A-AEP (siehe 9.1.) geben

flüssige Proben:

- 1 ml abnehmen und mit 4 ml final verdünnter Extraktions-Lösung 2 (siehe 9.1.) versetzen, gut mischen und verschließen, für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- auf die gekochte Probe 15 ml erwärmten (60 °C) A-AEP (siehe 9.1.) geben

festе und flüssige Proben wie folgt weiter bearbeiten:

- gründlich mischen (Schüttler)
- anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) extrahieren
- abkühlen lassen (z.B. Eisbad), zentrifugieren für 10 min / 2500 g (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den Überstand filtrieren (mit einem Papierfaltenfilter)
- den filtrierten Überstand 1:5 (1+4) mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer, ohne Additiv 1 (siehe 9.1.) verdünnen, z.B. 100 µl Überstand + 400 µl Puffer (1:100 final)
- (Anmerkung: diesen verdünnten Überstand unmittelbar in den Test einsetzen)
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

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 ELISA

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 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 Konjugatverdünnungspuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Puffer, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. 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 verdünnte 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 Milchprotein-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 gilt der Verdünnungsfaktor 100. Die Milchprotein-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden - der Probenverdünnungsfaktor 100 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe 4.*).

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:100 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Milchprotein-Konzentration berücksichtigt werden.

Anmerkungen:

Bei einem Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze, können in dem Lebensmittel noch weitere Milchbestandteile z.B. Lactose vorhanden sein.

Milch enthält ungefähr 3,2 % Milchproteine. Damit entspricht eine Probe mit einem Gehalt von 1 ppm Milchprotein einem Milchgehalt von ca. 31 ppm Milch.

Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- Milchprotein-freie und Milchprotein-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 Milk

Brief information

RIDASCREEN[®] FAST Milk (Art. No.: R4652) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of milk protein 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..... approx. 45 min
test implementation (incubation time)..... 30 min

Limit of detection: 0.7 mg/kg (ppm) milk protein

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) milk protein

Standard material: The RIDASCREEN[®] standard material is calibrated to the reference material NIST RM 1549 skim milk powder.

Specificity: The antibodies specifically detect α -, β - and κ -caseins as well as β -lactoglobulin of cow's milk and of sheep's, goat's and buffalo's milk.

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Milk is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of milk protein in food which may contain whey, milk or milk powder like sausages, ice cream, chocolate, bakery goods, cake and bread mix, soups, sauces, dressings and beverages (juice, wine, beer).

2. General

Cow`s milk contains 3.2 % proteins which consist of 10 % β -lactoglobulin (leading protein of whey) and 80 % caseins. The most important allergen is β -lactoglobulin especially for children while the caseins become to be dominant later in adults.

Casein (lat. Caseus = cheese) is a rough flaked curdling protein, which forms micells in the milk and precipitates under acidic conditions. The group of caseins consists of the α_s -caseins, the β -caseins, the κ -casein, and the γ -caseins (proteolytic protein fragment of β -casein by the milk protease plasmin). κ -casein is cleaved into a hydrophobic (para κ -casein) and into a water soluble polar component (macropeptid) by proteolysis, e.g. by using lab ferment.

The main components of whey are β -lactoglobulin and alpha-lactalbumin besides lactoferrin, bovine serum albumin and immunoglobulins.

Milk can be present as an ingredient or as a contamination in raw and processed food products. Because milk can induce allergic reactions at infancy it must be declared as an ingredient on food labels. Whey (β -lactoglobulin) or caseinates (e.g. in sausages) are often added to food products, therefore it is recommended to determine casein in food.

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 the milk proteins casein and β -lactoglobulin. By adding the standard or sample solution to the wells, present milk protein 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 milk protein 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-casein and anti- β -lactoglobulin antibodies
- 5 x Standards ^{*)}, 1.3 ml each
0 ppm (zero standard), 2.5 ppm, 7.5 ppm, 22.5 ppm, 67.5 ppm milk protein
in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (0.7 ml)red cap
peroxidase conjugated antibody, concentrate
- 1 x Conjugate dilution buffer (7 ml) black cap
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 Extraction Solution 2 (110 ml) blue cap
as a 2fold concentrate
- 1 x Wash buffer (100 ml) brown cap
as a 10fold concentrate
- 1 x Additive 1 (2 g) blue cap

^{*)} **The dilution factor 100** which results after sample preparation has already been considered for the standard concentrations. Therefore, the milk protein concentrations of the samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifugal vials
- water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F)

- fluted paper filter
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- distilled water
- 1 M hydrochloric acid (HCl)
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)

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).

The Extraction Solution 2 contains β-mercaptoethanol and should be handled carefully under a chemical hood.

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

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

The **Allergen Extraction buffer** is provided as a **10fold concentrate**. Before dilution dissolve possibly formed crystals by heating (water bath 37 °C) and mix well. Dilute the heated concentrate 1:10 (1+9) with distilled water (e.g. 100 ml concentrate + 900 ml dist. water) or fill up the whole content of the bottle to 1250 ml. The diluted Allergen Extraction buffer can be used for approx. 12 weeks at 2 - 8 °C.

For the preparation of the **Allergen Extraction buffer, containing Additive 1 (A-AEP)** weigh 1.8 g of Additive 1 in a glass beaker and add 20 ml 1 M NaOH. Stir until the Additive 1 is solved. Then fill 900 ml diluted Allergen Extraction buffer (see above) in a measuring cylinder. Add the 20 ml Additive 1 solution by stirring constantly, transfer eventually residues of the Additive 1 solution into the measuring cylinder by rinsing with diluted Allergen Extraction buffer. Adjust the Additive 1 containing Allergen Extraction (A-AEP) buffer to pH 9 with 1 M HCl and fill up to 1 L with diluted Allergen Extraction buffer.

1 L A-AEP buffer is sufficient for 60 samples. The buffer can be used for approx. 3 weeks at room temperature (20 - 25 °C) or for 8 weeks at 2 - 8 °C (if crystals precipitate the buffer must be discarded).

The **Extraction solution 2** is provided as a 2fold concentrate and has to be diluted 1:2 (1+1) with distilled water (e.g. 50 ml Extraction solution 2 + 50 ml dist. water). The complete diluted Extraction solution 2 is sufficient for 55 samples and can be used for approx. 3 month at room temperature (20 - 25 °C).

9.2. Sample extraction

–homogenize a representative amount of the sample (5 - 50 g)

Solid samples:

–take 1 g and add 4 ml prepared Extraction solution 2 (see 9.1.), mix vigorously, close the vial and cook it for 10 min at 100 °C in a water bath

–let the sample cool down shortly

–add 16 ml heated (60 °C) A-AEP (see 9.1.) to the cooked sample

Liquid samples:

- take 1 ml and add 4 ml prepared Extraction solution 2 (see 9.1.), mix vigorously, close the vial and cook it for 10 min at 100 °C in a water bath
- let the sample cool down shortly
- add 15 ml heated (60 °C) A-AEP to the cooked sample

further prepare solid and liquid samples as follows:

- mix vigorously (shaker)
- extract for 10 min at 60 °C in a water bath
- cool down (e.g. ice water), centrifuge for 10 min / 2500 g
(alternatively: 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- filter the supernatant (with fluted paper filter)
- dilute the sample 1:5 (1+4) with final diluted Allergen Extraction buffer, without Additive 1 (see 9.1.), e.g. 100 µl + 400 µl (1:100 final)
(**Remark:** use this diluted supernatant directly in the assay)
- use 100 µl per well in the assay

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 for the ELISA

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 a 11fold concentrate. Since the diluted enzyme conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be diluted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) with conjugate dilution buffer (e. g. 200 µl concentrate + 2 ml buffer, sufficient for 2 microtiter strips).

The **washing buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
4. Add 100 µl of the diluted 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 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 milk protein 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, the dilution factor is 100. The milk protein concentration can be read directly from the standard curve - the sample dilution factor of 100 is already taken into account for the standard concentrations (see 4. *).

For sample dilutions of more than 1:100 the further dilution factor must be considered for the calculation of the milk protein concentration.

Remarks:

If the result is below the detection limit, further milk constituents e.g. lactose may be present in the food sample.

Milk contains approx. 3.2 % milk protein. Thus a sample which contains 1 ppm milk protein corresponds to a milk content of approx. 31 ppm milk.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

- each sample material should be analyzed in duplicates
- use also milk protein free and milk protein 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.