

RIDASCREEN[®] Aflatoxin M₁

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Aflatoxin M₁

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
aflatoxin M₁

Art. No.: R1121

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® Aflatoxin M₁ (Art. Nr.: R1121) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch, Milchpulver und Käse.

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: | Milch: entfetten Milchpulver: rekonstituieren und entfetten Käse: extrahieren und entfetten |
| Zeitbedarf: | Probenvorbereitung (für 10 Proben) Milch und Milchpulver ca. 0,5 h Käse ca. 2 h Testdurchführung (Inkubationszeit) 1 h 15 min |
| Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz) | Milch: 5 ppt Milchpulver (bezogen auf rekonstituierte Milch): ... 5 ppt Milchpulver (bezogen auf g-Einwaage): 50 ppt Käse: 50 ppt |
| Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz) | in künstlich kontaminierter Vollmilch: ca. 85 % Milchpulver: ca. 96 % Käse: ca. 99 % |
| Spezifität: | Die Spezifität des RIDASCREEN® Aflatoxin M ₁ wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Mykotoxinen im Puffersystem ermittelt. Aflatoxin M ₁ 100 % Aflatoxin M ₂ < 10 % |

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch, Milchpulver und Käse.

2. Allgemeines

Aflatoxine sind karzinogene und hochtoxische Stoffwechselprodukte der Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxin M₁, das sog. Milch-Aflatoxin, entsteht als Metabolit des Aflatoxins B₁. Es wird nach Verfütterung Aflatoxin B₁-haltiger Futtermittel an laktierende Kühe mit der Milch ausgeschieden. Da Aflatoxin M₁ relativ stabil gegenüber dem Pasteurisierungsprozess ist, ist nicht nur eine routinemäßige umfangreiche Kontrolle der zu verarbeitenden Rohstoffe nötig, sondern auch die Kontrolle der Endprodukte.

Seit dem 1. Januar 1999 gelten EU-weite einheitliche Höchstgehalte für Aflatoxine. Für Aflatoxin M₁ wurde als Höchstwert 0,05 µg/l (50 ppt) festgelegt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin M₁-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden anti-Aflatoxin M₁-Antikörper, die von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden werden. Nach einem Inkubations- und Waschschrift werden Standards bzw. Probelösungen hinzu gegeben. Nach einer weiteren Inkubation mit nachfolgendem Waschschrift wird das enzymmarkierte Aflatoxin M₁ (Enzymkonjugat) zugefügt. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ konkurrieren um die Aflatoxin M₁-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin M₁ wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat-/Chromogenlösung. 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 zu der Aflatoxin M₁-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 Fänger-Antikörpern
- 6 x Standardlösungen (je 1,3 ml)
0 ppt (Nullstandard), 5 ppt, 10 ppt, 20 ppt, 40 ppt, 80 ppt
Aflatoxin M₁ in Milchpuffer
- 1 x anti-Aflatoxin M₁-Antikörper (1,3 ml).....schwarzer Verschluss
Konzentrat
- 1 x Konjugat (1,3 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugiertes Aflatoxin M₁
Konzentrat
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml)..... brauner Verschluss
Substrat-/Chromogenlösung, rötlich gefärbt
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffer (40 ml) weißer Verschluss
Probenverdünnungspuffer
- 1 x Konjugat-, Antikörperverdünnungs- und 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
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- Wasserbad (für Milchpulver- und Käseproben)

nur für Käseproben

- Schüttler
- Abdampfvorrichtung

5.2. Reagenzien:

nur für Käseproben

- Dichlormethan
- Methanol
- n-Hexan

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards enthalten Aflatoxin M₁, 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.

Aflatoxine sind lichtempfindlich, deshalb 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. Milch

- Milchproben zur Entfettung zentrifugieren: 10 min / 3500 g / 10 °C
(ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, muss die Milch vor dem Zentrifugieren auf 10 °C abgekühlt werden)
- nach dem Zentrifugieren die obere Sahneschicht vollständig entfernen, z. B. durch Absaugen mit einer Pasteurpipette
- fettarme Milch (= entfetteter Überstand) direkt im Test einsetzen (100 µl pro Kavität)

9.2. Milchpulver

- 10 g Milchpulver in ein Becherglas einwiegen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen
- unter Rühren homogenisieren
- die Milchpulver-Lösung im Wasserbad bei 50 °C für 30 min erwärmen
- anschließend wie für die Aufarbeitung von Milch (unter 9.1. beschrieben) weiter verfahren

9.3. Käse

Eine repräsentative Probe wird fein gemahlen. Bei Käsesorten mit Außenschimmel darf die Oberfläche nicht verwendet werden, da dies zu einer Störung des Testsystems führt.

- 2 g zerkleinerter Käse in ein verschließbares Glasgefäß einwiegen
- nach Zugabe von 8 ml Dichlormethan unter Rühren / Schütteln extrahieren
- Probe bei 50 °C für 30 min inkubieren
- Suspension zentrifugieren: 10 min / 4000 g oder höher / 10 - 15 °C
- 4 ml Extrakt (entspricht 1 g) evaporieren (bei 60 °C unter schwachem N₂-Strom)
- den öligen Rückstand in 0,5 ml Methanol (100 %) resuspendieren, 0,5 ml destilliertes Wasser hinzufügen und mit 2 ml Hexan entfetten, gut mischen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / 15 °C
- die obere Hexanphase vollständig absaugen
- ein Aliquot der unteren methanolisch-wässrigen Phase vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnehmen und davon einen Teil 1:10 (1+9) mit Probenverdünnungspuffer verdünnen (z. B. 50 µl mit 450 µl Puffer verdünnen)
- je 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Falls eine weitere Verdünnung erforderlich ist, diese mit Probenverdünnungspuffer (siehe 4.) vornehmen.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Das **Aflatoxin M₁-Enzymkonjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat mit Konjugatverdünnungspuffer 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. 400 µl Konzentrat + 4 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Die **anti-Aflatoxin M₁-Antikörperlösung** (Flasche mit schwarzem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Antikörperlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Antikörper-Konzentrat mit Antikörperverdünnungspuffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Antikörper-Konzentrat vor Entnahme gut mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Antikörperverdünnungspuffer verdünnt werden (z. B. 400 µl Konzentrat + 4 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Als **Konjugat-, Antikörperverdünnungs- und Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Puffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Puffer 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 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 100 µl der verdünnten Antikörperlösung in die entsprechend benötigten Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 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 der Standardlösung bzw. der nach Abschnitt 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln 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. Danach 100 µl der verdünnten Enzymkonjugat-Lösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 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.
8. Je 100 µl Substrat/Chromogenlösung (brauner Verschluss) in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
9. Je 100 µl Stopp-Reagenz (gelber Verschluss) in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 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 Aflatoxin M₁-Konzentration [ng/l] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Aflatoxin M₁-Konzentration in ng/l 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:

| | |
|---|----|
| Milch | 1 |
| Milchpulver (bezogen auf rekonstituierte Milch) | 1 |
| Milchpulver (bezogen auf g-Einwaage) | 10 |
| Käse | 10 |

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® Aflatoxin M₁

Brief information

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ (Art. No.: R1121) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in milk, milk powder and cheese.

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: | milk: degreasing milk powder: reconstitution and degreasing cheese: extraction and degreasing |
| Time requirement: | sample preparation (for 10 samples) milk and milk powder approx. 0.5 h cheese approx. 2 h test implementation (incubation time) 1 h 15 min |
| Detection limit: (corresponding to the standard substance) | milk: 5 ppt milk powder (referring to reconstituted milk): 5 ppt milk powder (referring to g-weight): 50 ppt cheese: 50 ppt |
| Recovery rate: (corresponding to the standard substance) | in spiked fatty milk: approx. 85 % milk powder: approx. 96 % cheese: approx. 99 % |
| Specificity: | The specificity of the RIDASCREEN® Aflatoxin M ₁ was established by analyzing the cross-reactivity to corresponding mycotoxins in buffer system. Aflatoxin M ₁ 100 % Aflatoxin M ₂ < 10 % |

1. Intended use

RIDASCREEN® Aflatoxin M₁ is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M₁ in milk, milk powder and cheese.

2. General

Aflatoxins are carcinogenic, highly toxic metabolites of the mold fungus varieties *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Aflatoxin M₁ is produced as a metabolite of aflatoxin B₁. It is secreted with the milk after feeding of aflatoxin B₁ containing feed to lactating cows. As aflatoxin M₁ is relatively stable towards the pasteurizing process, not only a comprehensive routine check of the raw materials to be processed is required, but also of the final products.

Since the first of January 1999 EU-wide uniform residue limits for aflatoxins exist. For aflatoxin M₁ the limit has been fixed at 0.05 µg/l (50 ppt).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells in the microtiter strips are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin M₁ antibodies. Anti-aflatoxin M₁ antibodies are added which are bound by the immobilized capture antibodies. After an incubation and washing step standards or sample solutions are added. After a further incubation with a subsequent washing step, the aflatoxin M₁ enzyme conjugate is added. Free and enzyme conjugated aflatoxin M₁ compete for the 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 and the absorption is inversely proportional to the aflatoxin M₁ 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 capture antibodies
- 6 x Aflatoxin M₁ standard solutions (1.3 ml each)
0 ppt (zero standard), 5 ppt, 10 ppt, 20 ppt, 40 ppt, 80 ppt
aflatoxin M₁ in milk buffer
- 1 x Anti-aflatoxin M₁ antibody (1.3 ml).....black cap
concentrate
- 1 x Conjugate (1.3 ml).....red cap
peroxidase conjugated aflatoxin M₁
concentrate
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) brown cap
Substrate/chromogen solution, stained red
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml) yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer (40 ml) white cap
sample dilution buffer
- 1 x Conjugate, antibody dilution and washing 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
- pasteur pipettes
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- water bath (for milk powder and cheese samples)

for cheese samples only

- shaker
- evaporator

5.2. Reagents:

for cheese samples only

- dichloromethane
- methanol
- n-hexane

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 standard solutions contain aflatoxin M₁, 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).

Aflatoxins are 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 red stained 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. Milk

- centrifuge milk samples for degreasing: 10 min / 3500 g / 10 °C (50 °F)
(if a refrigerated centrifuge is not available, chill sample to 10 °C (50 °F) prior to centrifugation)
- after centrifugation, remove upper cream layer completely by aspirating through a pasteur pipette
- use the skimmed milk (= defatted supernatant) directly in the test (100 µl per well)

9.2. Milk powder

- weigh 10 g milk powder in a flask and fill up to 100 ml with distilled water
- homogenize by stirring
- warming the milk powder solution to 50 °C (122 °F) in a water bath for 30 min
- continue with the preparation of milk as described in 9.1.

9.3. Cheese

A representative sample is finely ground. In the case of cheese varieties with external mold, the surface may not be used, as this leads to interference with the test system.

- weigh 2 g of the triturated cheese into a screw cap centrifugal glass vial
- add 8 ml dichloromethane and extract by stirring/shaking the vial
- incubate sample at 50 °C (122 °F) for 30 min
- centrifuge the suspension: 10 min / 4000 g / 10 - 15 °C (50 - 59 °F)
- evaporate 4 ml (corresponding to 1 g) of the extract at 60 °C (140 °F) under a weak N₂-stream
- redissolve the oily residue in 0.5 ml methanol (100 %), 0.5 ml distilled water and add 2 ml hexane for degreasing, mix thoroughly
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 15 °C (59 °F)
- remove the upper hexane-layer completely
- pour off an aliquot of the lower methanolic-aqueous phase carefully using a pasteur pipette and dilute a part of it 1:10 (1+9) with sample dilution buffer (e. g. dilute 50 µl with 450 µl buffer)
- use 100 µl per well in the test

remark:

If a further dilution is required, use sample dilution buffer (see 4.) for the dilution.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The aflatoxin M₁ 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 concentrate is diluted 1:11 (1+10) in conjugate dilution buffer (e.g. 400 µl concentrate + 4 ml buffer, sufficient for 4 microtiter strips).

The anti-aflatoxin M₁ antibody solution (bottle with black cap) is provided as a concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the antibody concentrate should be shaken thoroughly. For reconstitution, the antibody concentrate is diluted 1:11 (1+10) in antibody dilution buffer (e. g. 400 µl concentrate + 4 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

As **conjugate, antibody dilution and washing buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the buffer salt (see 4.) contained in the kit. Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled water. The ready to use 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 buffer. Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use buffer.

This solution 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 100 µl of diluted antibody solution to the bottom of each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 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 the washing procedure two times.
4. Add 100 µl of the standard solutions or prepared sample to separate duplicate wells. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
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 the washing procedure two times.
6. Add 100 µl of the diluted enzyme conjugate. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. 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.
8. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
9. Add 100 µl of the stop solution (yellow cap) to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 15 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 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 aflatoxin M₁ concentration [ng/l].

In order to obtain the aflatoxin M₁ concentration in ng/l 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:

| | |
|--|----|
| milk | 1 |
| milk powder (referring to reconstituted milk)..... | 1 |
| milk powder (referring to g-weight)..... | 10 |
| cheese | 10 |

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.