

RIDASCREEN[®] FAST Casein

Art. Nr. R4612

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Casein

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
casein

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard:

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

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: orders@r-biopharm.de

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : info@r-biopharm.de

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Marken 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 Casein (Art. Nr.: R4612) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Casein in Lebensmitteln wie Backwaren, Babynahrung 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. 20 min Probenvorbereitung (für 10 erhitzte Proben) ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit).....30 min
Nachweisgrenze:	Allergen Extraktionspuffer 0,12 mg/kg (ppm) Casein RIDA® Extractor 2 0,71 mg/kg (ppm) Casein
Bestimmungsgrenze:	Allergen Extraktionspuffer 0,5 mg/kg (ppm) Casein RIDA® Extractor 2 2,5 mg/kg (ppm) Casein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch die Caseine der Kuhmilch sowie Casein aus Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch.

Es besteht keine Kreuzreaktivität zu β -Lactoglobulin.

Die Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Antikörper wurden für das reine Lebensmittel (z.B. Maismehl) bestimmt. In einem zusammengesetzten / verarbeiteten Lebensmittel (z.B. Maisbrot) können diese Kreuzreaktivitäten verändert sein. Potentiell interferierende Substanzen (z.B. Polyphenole) können durch Spikeversuche erkannt werden.

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann

unter der Webseite www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

Produktangebot:

RIDA[®]Extractor 2 (R4613)

RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (R4901)

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4902)

RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652)

bioavid Lateral Flow Milch / Milk (BL613-10/-25)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN[®]FAST Casein ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Casein in Lebensmitteln wie Eis, Wein, Schokolade, Getränken, Babynahrung, Backwaren, Wurst und Backmischungen.

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.

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Milch als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Casein-Proteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Casein-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 Casein-Protein erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der

Casein-Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Casein angegeben.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen).

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
1 x Extractor 2 1 x Extraktor 2	blau	Konzentrat	2x	30 ml
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	grün	Konzentrat	10x	100 ml
Additive 1 Additiv 1	blau			2 g
Standard 1* Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	0,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	1,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	4,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	13,5 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Conjugate buffer Konjugat Puffer	schwarz	gebrauchsfertig		7 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop Solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

- *) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 20**, der sich aus der normalen Probenvorbereitung für Eis, Wein, Schokolade, Getränke und Babynahrung (siehe 9.1.) ergibt. So können die Casein-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Wird die Probenaufarbeitung mit Extractor 2 für alle anderen Proben angewandt (siehe 9.2.), 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:

- Waage
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Wasserbad
- Faltenfilter
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- Messzylinder
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- eventuell zusätzliche Mikrotiterplatte (z.B. low binding Greiner bio-one Kat.Nr. 655101)
- eventuell zusätzlich 8 Kanalpipette für 100 µl

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 1 M Natronlauge (NaOH)
- 1 M Salzsäure (HCl)
- Für die Aufarbeitung von Walnuss, Sonnenblumen-, Kürbis- oder Pinienkernen: Bovine Serum Albumin (BSA, Serva, Fraction V, Protease frei, Art. No. 11926.01)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieser Kit kann weitere gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

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.

Das Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiry) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 5
- geruchloser Extractor 2 nach mehrmaligem Öffnen der Flasche

9. Probenvorbereitung

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, müssen ebenfalls nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Allergenreste zu entfernen und Kontamination zu vermeiden.

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). 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 1,35 g Additive 1 in ein Becherglas eingewogen und mit 15 ml 1 M NaOH gelöst werden. Rühren bis sich das Additive 1 gelöst hat. Dann 700 ml verdünnten Allergen Extraktionspuffer (s.o.) in einen Messzylinder geben. Unter konstantem Rühren die 15 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 750 ml auffüllen.

750 ml A-AEP reicht für ca. 45 Proben. Der Puffer ist ca. 3 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar (**nicht** im Kühlschrank aufbewahren). Saubere Flaschen benutzen, da Stäube als Kristallisationskeime vermieden werden sollten. Den Puffer verwerfen, sobald Kristalle ausfallen.

Der **Extractor 2** liegt als 2fach Konzentrat vor und muss 1:2 (1+1) mit dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 30 ml Extractor 2 + 30 ml dest. Wasser). Der komplett verdünnte Extractor 2 ist ausreichend für 15 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C). Weiterer Extractor 2 kann bei R-Biopharm unter der Produktnummer R4613 bestellt werden.

Alle Lebensmittelproben können mit der Methode 9.2. aufgearbeitet werden. Lebensmittel wie Eis, Wein, Schokolade, Getränke und Babynahrung können auch nach 9.1. aufgearbeitet werden, um eine geringere Nachweisgrenze zu erreichen.

9.1. Lebensmittel wie Eis, Wein, Schokolade, Getränke, Babynahrung

Lebensmittel, welche Walnuss enthalten, sollten unter Zugabe von 0,5 g BSA extrahiert werden.

- 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen (Schokolade schmelzen) und gut mischen
- 1 g Probe abnehmen und mit 20 ml verdünntem RIDASCREEN® Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben). bzw. bei flüssigen Proben 1 ml Probe mit 19 ml verdünntem RIDASCREEN® Allergen Extraktionspuffer versetzen (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben). 1 ml Wein kann auch mit 9 ml verdünntem RIDASCREEN® Allergen Extraktionspuffer aufgearbeitet werden (LOD 0,25 mg/l; LOQ 0,5 mg/l)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubieren, danach abkühlen
- zentrifugieren: 10 min / 3000 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 des partikelfreien Überstands oder Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Probenextraktion mit Extractor 2 für alle anderen Proben

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

feste Proben:

- 1 g Probe abnehmen und mit 4 ml verdünnten Extractor 2 (siehe 9.) versetzen, gut mischen und verschließen, für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- 16 ml erwärmten (60 °C) A-AEP (siehe 9.) zu der gekochten Probe geben

flüssige Proben:

- 1 ml Probe abnehmen und mit 4 ml verdünnten Extractor 2 (siehe 9.) versetzen, gut mischen und verschließen, für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen
- 15 ml erwärmten (60 °C) A-AEP (siehe 9.) zu der gekochten Probe geben

feste und flüssige Proben wie folgt weiter bearbeiten:

- gründlich mischen (Schüttler)
- anschließend 10 min bei 60 °C (Wasserbad) extrahieren
- abkühlen lassen (z.B. Eisbad), für 10 min / 2500 g zentrifugieren und/oder filtrieren
(alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den partikelfreien Überstand oder das Filtrat 1:5 (1+4) mit verdünnten Allergen Extraktionspuffer, ohne Additiv 1 (siehe 9.) verdünnen (Wurstwaren sollten mit destilliertem Wasser verdünnt werden), 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

9.3. Probenextraktion von Walnuss, Sonnenblumenkernen-, Pinienkernen- und Kürbiskernen- enthaltenden Matrices

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g Probe abnehmen und mit 0,5 g BSA, 4 ml verdünnten Extractor 2 (siehe 9.) und 16 ml erwärmten (60°C) A-AEP (siehe 9.) versetzen, gut mischen und verschließen
- für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- Probe kurz abkühlen lassen (zum Beispiel im Eisbad)

- für 10 min / 2500 g zentrifugieren und/oder filtrieren (alternativ: 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den partikelfreien Überstand oder das Filtrat 1:5 (1+4) mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer, ohne Additiv 1 (siehe 9.) 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 von 9.1. sind bei 2 - 8 °C etwa 1 Tag haltbar. Extrakte aus 9.2. und 9.3 sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar. Nicht verwendete Extrakte aus 9.2 und 9.3 können bei -20°C einige Monate aufbewahrt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Das **Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 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 Konjugatpuffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml Konjugatpuffer ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** 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. Das Konzentrat vor Gebrauch 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 20 - 25 °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. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (z.B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101 oder Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

Es wird empfohlen das Konjugat, das Substrat/Chromogen und die Stopplösung mit einer Multikanal- oder einer Multistepper-Pipette zu pipettieren um einen Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden.

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 Standard 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat (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 der rötlich gefärbten Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopp Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), 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 Standardkurve im Vergleich zu den Daten lt. Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Casein-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen.

Bitte beachten:

Für Eis, Wein, Schokolade, Getränke, Babynahrung (siehe 9.1.):

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 20. Die Casein-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden (siehe 4. *) - der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt.

Bei Probenverdünnungen von z.B. 1:10 muss der veränderte Verdünnungsfaktor von 0,5 bei der Berechnung der Casein-Konzentration berücksichtigt werden.

Für Extraktion mit Extractor 2 (siehe 9.2.):

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 100. Der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt und deshalb müssen die aus der Standardkurve abgelesenen Werte zusätzlich mit Faktor 5 multipliziert werden.

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

Einschränkungen bei der Analyse von rohem Fisch:

Roher Fisch bindet Casein stark, aus diesem Grund kann die Wiederfindung bis zu 90 % reduziert sein. Das trifft auch auf gekochten Fisch zu, wenn Casein vor dem Kochen zugefügt wurde.

Generell:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Allergenkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass andere Komponenten, wie z.B. Lipide, in einer Probe enthalten sein können.

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmitteln können Matrixeffekte nicht ausgeschlossen werden. In prozessierten (z.B. Erhitzung, Trocknung, etc.) Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden, dies kann die Wiederfindung/Kreuzreaktivität beeinträchtigen.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten wurde jeweils eine exemplarische Probe verwendet, andere Proben können verschiedene Ergebnisse liefern. Alle Kreuzreaktivitäten und exemplarisch analysierten Matrices sind im Validierungsbericht beschrieben.

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, empfehlen wir:

- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- Bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Spike Versuche durchzuführen
- bei einer Analyse mittels dem ChemWell® oder GEMINI Automaten, sich für weitere Informationen bitte an info@r-biopharm.de zu wenden

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte sales@r-biopharm.de.

Weitere Applikationen:

- Extraktion für Wurstwaren mit dem Extractor 2 (Art. Nr. R4613)
- Extraktion von Pinien-, Sonnenblumen- und Kürbiskernen (Zugabe von BSA)
- Extraktion von Wein (Verdünnung 1:10)
- Extraktion von stark flüssigkeitsabsorbierenden Matrices mit RIDA[®] Extractor 2 (Art. Nr. R4613)
- Aufarbeitung von Lebensmitteln mit der RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098), diese Aufarbeitung gibt ähnliche Ergebnisse wie Extractor 2. Die Probenextrakte mit Extractor 2 können jedoch auch im RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4902) und im RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652) eingesetzt werden.

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®]FAST Casein

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Casein (Art. No.: R4612) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of casein in food, like bakery goods, sausages and baby 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 sample preparation (for 10 heated samples) approx. 30 min test implementation (incubation time) 30 min
Limit of detection:	Allergen extraction buffer 0.12 mg/kg (ppm) casein RIDA [®] Extractor 2 0.71 mg/kg (ppm) casein
Limit of quantification:	Allergen extraction buffer 0.5 mg/kg (ppm) casein RIDA [®] Extractor 2 2.5 mg/kg (ppm) casein
Specificity:	The antibodies specifically detect caseins of cow's milk and caseins of sheep's, goat's and buffalo's milk. There is no cross reactivity to β -lactoglobulin.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. maize bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework

conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDA[®] Extractor 2 (R4613)

RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (R4901)

RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4902)

RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652)

bioavid Lateral Flow Milch / Milk (BL613-10 / -25)

1. Intended use

RIDASCREEN[®]FAST Casein is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of casein in food like ice cream, wine, chocolate, beverages, infant formula, bakery goods, sausages, cake and bread mix.

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 for children is β -lactoglobulin 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 allergen can be present as an ingredient or as a contamination in raw and cooked products. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011** milk and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to casein. By adding standards and samples to the wells, casein 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 casein 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 casein concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg casein.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
1 x Extractor 2	Blue	Concentrate	2x	30 ml
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Additive 1	Blue			2 g
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	0.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	1.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	4.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	13.5 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Conjugate buffer	Black	Ready to use		7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*) **The dilution factor 20** which results after sample preparation for ice cream, wine, chocolate, beverages, infant formula (see 9.1.) has already been considered for the standard concentrations. Therefore, the casein concentrations of the samples can directly be read from the standard curve.

The sample preparation with Extractor 2 (see 9.2.) is used, it results in a **dilution factor of 100**. Therefore the concentrations read from the standard curve have to be multiplied additionally by factor 5.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- scale
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal vials
- water bath
- fluted filter
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- graduated cylinder
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- optionally a further microtiter plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101)
- optionally 8-channel pipette for 100µl

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- 1 M sodium hydroxide (NaOH)
- 1 M hydrochloric acid (HCl)
- for the extraction of walnut, sunflower-, pumpkinkernels and pine nuts: bovine serum albumin (BSA, Serva, fraction V, protease free, Art. No. 11926.01)

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.

This kit may contain further hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at www.r-biopharm.com.

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 is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiry 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
- odorless Extractor 2 after repeated opening of the bottle

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 casein 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). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. twelve weeks.

For the preparation of the **Allergen Extraction buffer containing Additive 1 (A-AEP)** weigh 1.35 g of Additive 1 in a glass beaker and add 15 ml 1 M NaOH. Stir until the Additive 1 is solved. Then fill 700 ml diluted Allergen Extraction buffer (see above) in a measuring cylinder. Add the 15 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 750 ml with diluted Allergen Extraction buffer.

750 ml A-AEP buffer is sufficient for 45 samples. The buffer can be used for approx. 3 weeks at room temperature 20 - 25 °C (68 - 77 °F) (do **not** store in the refrigerator). Use clean bottles as particles of dust can initiate crystallization. Discard the buffer if crystals are present.

Extractor 2 is provided as 2fold concentrate and has to be diluted 1:2 (1+1) with distilled water (e.g. 30 ml Extractor 2 + 30 ml dist. water). The complete diluted Extractor 2 is sufficient for 15 samples and can be used for approx. 3 month at room temperature (20 - 25 °C). Additional Extractor 2 can be ordered at R-Biopharm with the product number R4613.

All food samples can be extracted according to method 9.2. Food such as ice cream, wine, chocolate, beverages and infant formula can also be extracted according to 9.1. to reduce the limit of quantification.

9.1. Food like ice cream, wine, chocolate, beverages, infant formula

Food, which contains walnut, should be extracted after addition of 0.5 g BSA.

- ground well 5 g of the sample (melt chocolate) and mix thoroughly
- weigh 1 g of sample, add 20 ml of diluted Allergen Extraction buffer (the extraction buffer should have already been heated to approx. 60 °C (140 °F))
- or add 19 ml of the diluted Allergen Extraction buffer (the extraction buffer should have already been heated to approx. 60 °C (140 °F)) to 1 ml liquid sample; 1 ml of wine can be extracted with 9 ml diluted Allergen extraction buffer (LOD 0.25 mg/l; LOQ 0.5 mg/l)
- mix intensively and incubate for 10 min at 60 °C (140 °F) by shaking occasionally, let the sample cool down afterwards
- centrifuge: 10 min / 3000 g / if possible at 4 °C (39 °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 of the particle free supernatant or filtrate per well in the assay

9.2. Sample extraction with Extractor 2 for all other samples

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

solid samples:

- take 1 g and add 4 ml prepared Extractor 2 (see 9.), 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.) to the cooked sample

liquid samples:

- take 1 ml and add 4 ml prepared Extractor 2 (see 9.), 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 and/or filter (alternative: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed for 10 min in a microcentrifuge)
- dilute the particle free supernatant or the filtrate 1:5 (1+4) with diluted Allergen Extraction buffer, without Additive 1 (see 9.) (samples such as sausage should be diluted with distilled water), e.g. 100 µl + 400 µl (1:100 final) (**Remark:** use this diluted supernatant immediately in the assay)
- use 100 µl per well in the assay

9.3. Sample preparation of sunflower seeds, walnuts, pumpkin seeds and pine nut containing matrices

- take 1 g and add 0.5 g BSA, 4 ml prepared Extractor 2 (see 9.) and 16 ml heated (60 °C) A-AEP (see 9.), mix vigorously, close the vial and cook it for 10 min at 100 °C in a water bath
- cool down (e.g. ice water), centrifuge for 10 min / 2500 g and/or filter (alternative: transfer 2 ml of the extract into a reaction vial and centrifuge at high speed for 10 min in a microcentrifuge)
- dilute the particle free supernatant or the filtrate 1:5 (1+4) with diluted Allergen Extraction buffer, without Additive 1 (see 9.), e.g. 100 µl + 400 µl (1:100 final) (**Remark:** use this diluted supernatant immediately in the assay)
- use 100 µl per well in the assay

The sample extracts of 9.1. can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 1 day. Extracts of 9.2. and 9.3. can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days. Not used extracts from 9.2 and 9.3 can be stored at -20°C (-4°F) for several months.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

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

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before dilution of the concentrate, dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99 °F) completely and mix well. The concentrate 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 20 - 25 °C (68 - 77 °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. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101 or Mikrotiter Assembly Breakable Strip 1x8, Thermo Scientific) should be used as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and then quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette. It is recommended to pipette the conjugate, the substrate/chromogen and the stop solution with a multi-channel or stepper pipette to avoid a time shift over the plate.

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 or prepared sample to separate wells in duplicate 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 wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.

4. Add 100 µl of the diluted conjugate (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 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 wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl of the reddish Substrate/Chromogen 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.

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 / RIDA[®]SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), 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 casein contamination.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5.

Please note:

For ice cream, wine, chocolate, beverages, infant formula (see 9.1.):

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 20. The casein concentration can be read directly from the standard curve (see 4. *) - the sample dilution factor of 20 is already taken into account for the standard concentrations.

For sample dilutions of e.g. 1:10 the dilution factor must be modified to 0.5 for the calculation of the casein concentration.

For extraction with Extractor 2 (see 9.2.):

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 100. The sample dilution factor of 20 is already taken into account for the standard concentrations and therefore the concentrations read from the standard curve have to be multiplied additionally by factor 5.

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

Limitations for the analysis of raw fish:

Raw fish binds casein strongly, therefore the recovery can be reduced up to 90 %. This is also true for cooked fish if casein is added before cooking.

In general:

Samples tested negative still could contain an allergen contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other allergen components like lipids for example.

Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. In processed food (e.g. heat treatment, dehydration, etc.), proteins may be altered or fragmented, this may have an impact on the recovery/cross reactivity.

For evaluation of the cross reactivity only one exemplary sample was analyzed, other samples may show a different result. All cross reactivities and exemplary analyzed matrices are described in the Validation report.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance we recommend:

- to analyze each sample material ~~should~~ in duplicates
- to use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls
- in case of extremely acid or alkaline samples, the pH should be adjusted to a neutral pH
- to carry out spiking experiments for an accurate and correct procedure
- For details using the ChemWell® or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

Further information and application notes are available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

Further application notes:

- Extraction for sausages using RIDA[®] Extractor 2 (Art. No. R4613)
- Extraction of pine nut, sunflower kernels and pumpkin kernels (addition of BSA)
- Sample preparation for wine (dilution 1:10)
- Sample extraction for heavily liquid absorbing matrices using RIDA[®] Extractor 2 (Art. No. R4613)
- Sample preparation for food samples with the RIDA[®] Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098), that sample preparation results in similar values compared to Extractor 2. Sample extracts with Extractor 2 can also be used both in the RIDASCREEN[®]FAST β -Lactoglobulin (R4902) and in the RIDASCREEN[®]FAST Milk (R4652) assays.

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. 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. Defective products will be replaced. 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.

R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

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

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321