

RIDASCREEN[®] FAST β -Lactoglobulin

Art. No.: R4902

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von β -Lactoglobulin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
 β -lactoglobulin

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 β -Lactoglobulin (Art. Nr. R4902) ist ein Sandwich Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem β -Lactoglobulin in Getränken und Lebensmitteln.

Für den Nachweis von β -Lactoglobulin in hydrolysierten Milchprodukten, einschließlich hypoallergener Babynahrung, wird der kompetitive Enzymimmunoassay RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (Art. Nr.: R4901) empfohlen.

Für den Nachweis von Caseinen oder Caseinaten in Lebensmitteln wird der RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612) empfohlen.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays, inkl. Standards, sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 45 min Testdurchführung (Inkubationszeit) 30 min
Nachweisgrenze:	0,19 mg/kg (ppm) β -Lactoglobulin
Bestimmungsgrenze:	0,5 mg/kg (ppm) β -Lactoglobulin
Wiederfindungsrate:	100 % β -Lactoglobulin ca. 100 % in Milchpulver, Magermilchpulver, H-Milch ca. 120 % in Rohmilch und Vollmilch ca. 80 % in Süßmolkepulver
Spezifität:	die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch β -Lactoglobulin von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Büffel-Milch keine Kreuzreaktivität zu Casein, Lactalbumin, Lactoferrin und Ovalbumin es besteht eine Kreuzreaktivität von 0,0005% zu Hanfsamen.

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

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. Nr. R4652)

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. Nr. R4612)

RIDASCREEN® β-Lactoglobulin (Art. Nr. R4901)

RIDA® Extractor 2 (Art. Nr. R4613)

Bioavid Lateral Flow Milch/Milk (Art. Nr. BL613-10 / BL613-25)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (Art. Nr. R4902) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem β-Lactoglobulin in molke-, milch- oder milchpulverhaltigen Produkten. Dies betrifft Getränke wie Saft, Wein, Bier und Lebensmittel wie Wurst, Dressings, Backwaren, Eis, Schokolade, Joghurt etc.

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.

Milch kann schon im Säuglingsalter allergische Reaktionen hervorrufen. Lebensmitteln wird oft gezielt Molke oder Milchpulver zugesetzt. Deshalb empfiehlt es sich, Lebensmittel auf β-Lactoglobulin zu untersuchen.

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach der **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 β -Lactoglobulin beschichtet. Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes β -Lactoglobulin 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 β -Lactoglobulin 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 β -Lactoglobulin Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg β -Lactoglobulin 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
3 x Extractor 2 3 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	0,0 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
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 100, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die β -Lactoglobulin-Konzentration der Probe direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzröhrchen
- Wasserbad 60 °C und 100 °C
- Papierfilter
- variable 20 - 200 μ l und 200 - 1000 μ l 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 Extractor 2 ist gesundheitsschädlich, er enthält Mercaptoethanol. Daher sollte unter dem Abzug gearbeitet werden und Hautkontakt vermieden werden (Handschuhe tragen).

Dieser Kit kann 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.

Die rote Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen. Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, Glasgefäße oder Spatel müssen vor und nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Milchreste 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.

Die **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 45 Proben und hat eine Haltbarkeit von 3 Monaten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C).

9.1. Probenextraktion mit Extractor 2

–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, 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.

Die mittels Extractor 2 erhaltenen Extrakte können auch im RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) und im RIDASCREEN®FAST Milk (R4652) eingesetzt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen ELISA

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

Das **Konjugat** (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 dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml dest. Wasser, 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. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (z.B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101) 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.

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 Standards 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 verdünntes Konjugat 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/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 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 / 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 Allergen-Kontamination hinweisen.

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

Bitte beachten

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 100. Die Allergen-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 β -Lactoglobulin-Konzentration berücksichtigt werden.

Rechenbeispiel

Dem Lebensmittel wurde Kuhmilch zugesetzt (Angaben zum Proteingehalt von Kuhmilch, siehe 2. Allgemeines).

Aus der Standardkurve wird 0,5 mg/kg β -Lactoglobulin abgelesen (eine Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ist nicht nötig). Dies entspricht einem Gesamtmilchproteingehalt von ca. 5 mg/kg ($0,5\text{ mg/kg} \times 3,2\% / 0,3\% = 5,33\text{ mg/kg}$) und einem Gesamtmilchgehalt von ca. 156 mg/kg ($100\% \times 5\text{ mg/kg} / 3,2\%$).

Anmerkungen

Bei einem Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze, können in dem Lebensmittel noch weitere Milchbestandteile wie Caseine und / oder Lactose vorhanden sein.

β -Lactoglobulin entspricht ungefähr 10 % des gesamten Milchproteins. Damit entspricht eine β -Lactoglobulinprobe mit einem Gehalt von 0,2 mg/kg einem Milchproteingehalt von ca. 2 mg/kg.

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 Lebensmitteln können Proteine verändert und/oder fragmentiert werden, dies kann die Wiederfindung beeinträchtigen.

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung sollten Spike Versuche durchgeführt werden
- Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für fragmentierte Proteine vermindert, daher sollten entsprechende Proben mit einem kompetitiven ELISA Testsystem, wie dem RIDASCREEN® β -Lactoglobulin (R4901), analysiert werden
- 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
- sollte eine Analyse mittels dem ChemWell® oder GEMINI Automaten erfolgen, wenden Sie sich für weitere Informationen bitte an info@r-biopharm.de

Für weitere Produktinformationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Weitere Applikationen

- Extraktion für extrem Flüssigkeit absorbierende Matrices mit RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

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 β -Lactoglobulin

Brief information

RIDASCREEN[®] FAST β -Lactoglobulin (Art. No. R4902) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of native and processed β -lactoglobulin in beverages and food.

For the detection of β -lactoglobulin in hydrolysed milk products, including hypoallergenic baby food, the use of the competitive enzyme immunoassay RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (Art. No. R4901) is recommended.

For the detection of caseins or caseinates in food, the use of RIDASCREEN[®] FAST Casein (Art. No. R4612) is recommended.

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 and extraction

Time requirement: sample preparation (for 10 samples) approx. 45 min
test implementation (incubation time) 30 min

Limit of detection: 0.19 mg/kg (ppm) β -lactoglobulin

Limit of quantification: 0.5 mg/kg (ppm) β -lactoglobulin

Recovery rate: 100 % β -lactoglobulin,
approx. 100 % in milk powder, skim milk powder, UHT-milk
approx. 120 % in raw milk and whole milk
approx. 80 % in whey powder

Specificity: the antibodies specifically detect β -lactoglobulin of cow's, sheep's, goat's, and buffalo's milk
no cross reactivity to casein, lactalbumin, lactoferrin or ovalbumin
cross reactivity to hemp seeds about 0.0005% was observed

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. corn 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

RIDASCREEN®FAST Milk (Art. No. R4652)

RIDASCREEN®FAST Casein (Art. No. R4612)

RIDASCREEN® β-Lactoglobulin (Art. No. R4901)

RIDA® Extractor 2 (Art. No. R4613)

Bioavid Lateral Flow Milch/Milk (Art. No. BL613-10 / BL613-25)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST β-Lactoglobulin (Art. No. R4902) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of native and processed β-lactoglobulin in whey, milk or milk powder containing products. Such products are beverages like juice, wines, beer and food like sausages, dressings, bakery products, ice, chocolate, yoghurt, etc.

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 especially for children is β-lactoglobulin. For adults the caseins become more dominant.

Milk can induce allergic reactions at infancy. Whey or milk powder is often added to food products, therefore it is recommended to determine β-lactoglobulin in food. 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 β -lactoglobulin. By adding standards and samples to the wells, β -lactoglobulin 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 β -lactoglobulin 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 β -lactoglobulin concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg β -lactoglobulin.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
3 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
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*) The dilution factor of 100 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the β -lactoglobulin concentration of samples can directly be read from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal vials
- water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F)
- 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 be performed only by trained laboratory staff. The instructions for performing the test must be followed strictly.

The Extractor 2 is harmful to health. It contains mercaptoethanol.

It should be worked under a chemical hood and skin contact should be avoided (use gloves).

This kit may contain 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 reddish substrate/chromogen 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 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

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use. Working devices such as a mill, glass vials or spatulas must be cleaned before and after each sample preparation to remove any remains of milk and to avoid contamination.

The **Allergen extraction buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before dilution of the buffer concentrate completely dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99°F) and mix well. Following this, 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.

The **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 45 samples and can be used for approx. 3 month at room temperature (20 - 25 °C).

9.1. Sample extraction with Extractor 2

- 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.), 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 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.

Sample extracts with Extractor 2 can also be used both in the RIDASCREEN®FAST Casein (R4612) and in the RIDASCREEN®FAST Milk (R4652) assays.

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

The **wash buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before dilution of the buffer concentrate completely dissolve any crystals in a water bath at 37 °C (99 °F) and mix well. Following this, 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 wash buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for approx. four weeks.

10.2. Test procedure

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

Do not use more than 3 strips (24 wells) at a time. In the case of more than three strips, a second uncoated plate (e.g. low binding from Greiner bio-one Cat.-No. 655101) 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.

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 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 wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat three more times.
4. Add 100 µl of the diluted 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 wash 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 the 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 standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.

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

Please note:

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 100. The allergen 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 β -lactoglobulin concentration.

Calculation example

Cow's milk was added to the food sample (remarks to the protein content of cow's milk, see 2. General).

0.5 mg/kg β -lactoglobulin is read from the calibration curve (a multiplication with the dilution factor is not necessary. This corresponds to approx. 5 mg/kg total milk protein ($0.5 \text{ mg/kg} \times 3.2 \% / 0.3 \% = 5.33 \text{ mg/kg}$) and a total milk content of approx. 156 mg/kg ($100 \% \times 5 \text{ mg/kg} / 3.2 \%$).

Remarks:

If the result is below the detection limit, further milk constituents such as casein and / or lactose may be present in the food sample.

As β -lactoglobulin represents about 10 % of the total milk protein, a 0.2 ppm β -lactoglobulin containing sample corresponds to approx. 2 ppm milk protein.

In general

Samples tested negative could still 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, proteins may be altered or fragmented, this may have an impact on the recovery.

Recommendation:

In order to ensure high analytical performance:

- Each sample material should be analyzed in duplicates.
- Use allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls.
- Due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. To ensure an accurate result spike experiments are recommended
- The recovery for fragmented proteins is reduced in sandwich ELISA, such samples should be analyzed with a competitive ELISA test systems like the RIDASCREEN[®] β -Lactoglobulin (R4901)
- For evaluation of the cross reactivity only one exemplary sample was analyzed, other samples may show a different result, all cross reactivities and exemplarily analyzed matrices are described in the validation report
- For details using the ChemWell[®] or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

The product information folder with further information is available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

Futher Applications

- Extraction for heavily liquid absorbing matrices using RIDA[®]Extractor 2 (Art. No. R4613)

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