

RIDASCREEN[®] FAST Macadamia

Art. No. R6852

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Macadamia-Nuss

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
macadamia nut

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 Macadamia (Art. Nr.: R6852) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Macadamia-Nuss in Lebensmitteln.

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

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

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren, extrahieren und zentrifugieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben).....ca. 20 min
Testdurchführung (Inkubationszeit).....30 min

Nachweisgrenze: 0,38 mg/kg (ppm) Macadamia-Nuss
(abhängig von der Matrix)

Bestimmungsgrenze: 1,00 mg/kg (ppm) Macadamia-Nuss

Spezifität: Die eingesetzten Antikörper reagieren spezifisch mit Macadamiaproteinen

Es sind Kreuzreaktivitäten zu Kidneybohnen, Wachtelbohnen, Weißer Bohne, Walnüssen, Pekannüssen, Erbsen, Mohnsamen, gerösteten Mandeln, gerösteten Haselnüssen, gerösteten Erdnüssen, Linsen und Cashewnüssen bekannt.

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

bioavid Lateral Flow Macadamia nut (BL605-10)

Sure Food[®] Macadamia (S3116)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN[®]FAST Macadamia ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Macadamia-Nuss in Gebäck, Eiscreme, Zerealien und Schokolade.

2. Allgemeines

Das Allergen kann entweder als Ingredienz oder als Kontamination in rohen oder erhitzten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Macadamia als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein.

Macadamia-Nüsse sind unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt, wie zum Beispiel Bopple nut, Australische Nuss, *Macadamia integrifolia*, *Macadamia tetraphylla*, Bush nut und Queensland nut. Die Nüsse stellen die Samen der Macadamia-Pflanze dar, die zur Familie der Proteaceae gehört.

Macadamia-Nüsse werden hauptsächlich in Snacks, Backwaren, Eiskreme und Schokolade konsumiert. Der Proteingehalt von Macamia-Nüssen ist mit 7 – 8 % relativ gering. Dafür ist der Fettgehalt mit ca. 73 % sehr hoch.

Bereits der Verzehr von wenigen Milligramm Macadamia-Nuss kann allergische Reaktionen verursachen (anaphylaktischer Schock).

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Macadamia-Nuss beschichtet. Bei Zugabe von Standard oder Probe binden vorhandene Macadamia-Proteine an die spezifischen Antikörper. Das Resultat ist ein Antikörper-Antigen-Komplex.

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

Nach anschließender Auswaschung überschüssiger Reagenzien erfolgt der Nachweis durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das an den Antikörper gebundene Enzym wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Macadamia-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
Allergen extraction buffer Allergen Extraktionspuffer	grün	Konzentrat	10x	100 ml
Standard 1* Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 mg/kg	1,3 ml
Standard 2* Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	1 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	3 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	9 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	27 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 20, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Macadamia-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
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- für Schokoladen-haltige Proben: Polyvinylpyrrolidon (Sigma, Art.Nr. PVP-10 oder PVP-17), Gelatine (Sigma, Art.Nr. G-7765, 45 %)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

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

9. Probenvorbereitung

Spuren von Macadamia-Nüssen aus früheren Analysen müssen unbedingt entfernt werden! Die Aufarbeitung der Proben sollte daher in gut gespülten oder neuen Glasgefäßen vorgenommen werden.

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, müssen ebenfalls nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Macadamia-Reste zu entfernen.

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C vollständig lösen und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser).

Der verdünnte Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. vier Wochen bei 20-25 °C.

9.1. Probenaufarbeitung

- 5 g Probe sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen
- 1 g Probe abnehmen und mit 20 ml vorgewärmtem Allergen Extraktionspuffer versetzen (bzw. 1 ml Probe mit 19 ml Allergen Extraktionspuffer versetzen) (der Extraktionspuffer sollte eine Temperatur von ca. 60 °C haben)
- intensiv mischen und für 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den Überstand filtrieren
- 100 µl des filtrierten Überstands pro Kavität im Test einsetzen

9.2. Schokoladen-haltige Proben

- 11,1 g 45%ige Gelatine mit 2 g Polyvinylpyrrolidon (PVP) in 20 ml Wasser mischen und lösen und mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer (AEP) auf 500 ml auffüllen
- Schokoladenprobe schmelzen (30-40 °C) und mischen

- 1 g Schokolade abnehmen und mit 20 ml vorgewärmtem Gelatine-PVP-AEP 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln extrahieren
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, möglichst bei 4 °C und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den Überstand filtrieren
- 100 µl des filtrierten Überstands pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar.

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. 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 + 2,0 ml dest. Wasser, 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 Multistep-Pipette zu pipettieren um eine 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 Standards bzw. der vorbereiteten Proben 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 final verdünntes Konjugat 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 des rötlich gefärbten Substrat-/Chromogens 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-Lösung messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN[®] Enzymimmunoassays entwickelte Software, die 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 20. Die Macadamia-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden (siehe 4. *) - der Probenverdünnungsfaktor 20 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt.

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:20 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Macadamia-Konzentrationen berücksichtigt werden.

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.

Das Ergebnis der Quantifizierung hängt von der Art und Dauer der Hitzebehandlung ab, so dass bei hoch erhitzten Proben die Wiederfindung stark reduziert sein kann.

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.

Empfehlung

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
- zur Bestätigung des Ergebnisses eine PCR von SureFood[®] 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 info@r-biopharm.de.

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 Macadamia

Brief information

RIDASCREEN®FAST Macadamia (Art. No.: R6852) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of macadamia nut in food.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization, extraction and centrifugation
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) approx. 20 min test implementation (incubation time)30 min
Limit of detection:	0.38 mg/kg (ppm) macadamia nut
Limit of quantification:	1.00 mg/kg (ppm) macadamia nut (depending on the matrix)
Specificity:	The antibodies used in the test specifically reacts with macadamia proteins. Cross reactivities to green peas, kidney beans, pinto beans, white beans, poppy seeds, roasted almonds, cashew, roasted hazelnut, roasted peanuts, pecan nut, lentils and walnut have been 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. 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

bioavid Lateral Flow Macadamia nut (BL605-10)

Sure Food[®] Macadamia (S3116)

1. Intended use

RIDASCREEN[®]FAST Macadamia is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of macadamia nut in bakery products, ice cream, cereals and chocolate.

2. General

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** macadamia must be declared on food labels.

Macadamia nuts are also known by various other names like Bopple nut, Australian nut, *Macadamia integrifolia*, *Macadamia tetraphylla*, Bush nut and Queensland nut. The nuts are the seeds of the Macadamia plant which belongs to Proteaceae family.

Macadamia nuts are mainly consumed in snacks, bakery products, ice cream and chocolate. The protein content of macadamia nuts is relatively low with approx. 7 - 8 %. Consequently, madadamia nuts have a high fat content of approx. 73 %. Even consumption of a few milligrams of macadamia nuts can induce allergic reactions (anaphylactic shock).

3. Test principle

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

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

Substrate/chromogen is added after removing any unbound enzyme conjugate in a washing step. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue

product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is proportional to the macadamia concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/ ml	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	1 mg/ ml	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	3 mg/ ml	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	9 mg/ ml	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	27 mg/ ml	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 20 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the macadamia 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
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- for chocolate containing samples: polyvinylpyrrolidon (Sigma, Art.No. PVP-10 or PVP-17), gelatine (Sigma, Art.No. G-7765, 45 %)

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 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

Macadamia nut residues of previous analyses have to be removed completely! Therefore, samples should be prepared in new or very well cleaned glass vials.

Tools such as mincers have to be cleaned thoroughly after use, in order to avoid spreading traces of macadamia.

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 20 - 25 °C (68 -77 °F) for approx. four weeks.

9.1. Sample preparation

- grind 5 g of the sample accurately and mix thoroughly
- weigh 1 g of the sample and add 20 ml preheated Allergen Extraction buffer (or add 19 ml Allergen Extraction buffer to 1 ml sample) (the extraction buffer should have a temperature of 60 °C (140 °F))
- mix intensively and extract for 10 min at 60 °C (140 °F) by shaking
centrifuge: 10 min, at least 2500 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)
- filter the supernatant
- use 100 µl of the filtered supernatant per well in the assay

9.2. Chocolate containing samples

- mix 11.1 g 45 % gelatine with 2 g polyvinylpyrrolidon (PVP) in 20 ml water and fill it up to 500 ml with final diluted Allergen Extraction buffer (AEP)
- melt chocolate samples (30-40 °C) and mix
- use 1 g chocolate and extract by shaking with 20 ml preheated gelatine-PVP-AEP 10 min at 60 °C (140 °F)
- centrifuge: 10 min, at least 2500 g, if possible at 4 °C (39 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged at high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- filter the supernatant
- use 100 µl of the filtered supernatant per well in the assay

Remark:

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days.

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 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 dissolve crystals that may have been formed in a water bath at 37 °C (99 °F) completely. Before use the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water). The diluted wash 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 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 finally 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 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.
7. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win.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 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 20. The macadamia concentration can be read directly from the standard curve (see 4. *) - the sample dilution factor of 20 is already taken into account).

For sample dilutions of more than 1:20 the further dilution factor must be considered for the calculation of the macadamia concentration.

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.

The reduction in recovery depends strongly on the temperature and the duration of the heat treatment. If samples are heat treated at high temperature the recovery can be significantly reduced.

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 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
- to perform SureFood[®] PCR for confirmation of the result
- For details using the ChemWell[®] or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

For further product information and application notes, please contact sales@r-biopharm.de.

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