

RIDASCREEN[®] Gliadin competitive

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Peptidfragmenten der Gliadine und verwandter Prolamine

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of peptide fragments of gliadins and corresponding prolamins

Art. No. R7021

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing / Vertrieb:

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

Kurzinformation

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) wird für die Analyse fermentierter bzw. hydrolysierter Lebensmittel (z.B. Bier, Stärkesirup, Stärke, Malzextrakt, Sauerteig, Sojasauce) verwendet, die als „glutenfrei“ deklariert werden.

Der kompetitive Enzymimmunoassay quantifiziert Prolamin-Peptidfragmente aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein). Der eingesetzte monoklonale Antikörper R5 erkennt unter anderem die potentiell toxische Sequenz QQPFP, die wiederholt in den Prolamin-Molekülen vorkommt.

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) wurde durch die AACCI validiert und ist offizielle Methode ‚AACCI 38-55.01‘.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays sind im Testkit enthalten. Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen). Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: homogenisieren, extrahieren

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 30 min
Testdurchführung (Inkubationszeit) 40 min

Nachweisgrenze: 1,36 mg Gliadin / kg Lebensmittel

Bestimmungsgrenze: 5 mg Gliadin / kg Lebensmittel

Standardmaterial: Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist ein Hydrolysat (Gemisch aus Weizen, Roggen, Gerste).

Spezifität: Der monoklonale R5 Antikörper erkennt potentiell toxische Peptid-Sequenzen der Gliadine aus Weizen und der verwandten Prolamine aus Roggen und Gerste.

Kreuzreaktivität: Keine Kreuzreaktivität zu Soja, Hafer, Mais, Reis, Hirse, Teff, Buchweizen, Quinoa und Amaranth.

Produktangebot:

RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001)

RIDASCREEN® FAST Gliadin (Art. Nr. R7002)

RIDA® QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003, R7004, R7005)

RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098)

Cocktail (patented) (Art. Nr. R7006, R7016)

Set of 3 Gliadin Assay Controls (Art. Nr. R7010)

Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. Nr. R7012)

SureFood® ALLERGEN (real time PCR) Gluten (Art. Nr. S3106)

SureFood® ALLERGEN QUANT (real time PCR) Gluten (Art. Nr. S3206)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) wird für die Analyse fermentierter bzw. hydrolysierter Lebensmittel (z.B. Bier, Stärkesirup, Stärke, Malzextrakt, Sauerteig, Sojasauce) verwendet, die als „glutenfrei“ deklariert sind.

2. Allgemeines

Weizenmehl und Gluten werden häufig in Nahrungsmitteln eingesetzt, um z.B. die Textur, das Zurückhalten von Feuchte und den Geschmack zu verbessern. Als Gluten bezeichnet man das Proteingemisch aus Prolaminen und Glutelinen, welches in Weizen, Roggen und Gerste vorkommt.

Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Nach dem Codex Alimentarius (Alinorm 08/31/26) gibt es nun zwei "Stufen" für die Bezeichnung von Lebensmitteln hinsichtlich ihres Glutengehaltes:

1. "**Glutenfrei**" sind Lebensmittelprodukte, die den Grenzwert von 20 mg/kg Gluten einhalten.

2. Produkte, gekennzeichnet mit "**sehr geringer Glutengehalt**", dürfen mehr als 20 und höchstens 100 mg Gluten pro kg enthalten.

Die offizielle Standardmethode zur Glutenbestimmung ist nach dem Codex Alimentarius ein ELISA unter Verwendung des R5-Antikörpers (Mendez); der Sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. Nr. R7001, R7002) ebenso wie der RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) erfüllen diese Anforderung.

Bei der Lebensmittelverarbeitung wie z.B. Fermentation oder Hydrolyse werden intakte Prolamin-Moleküle teilweise oder vollständig zu Peptidfragmenten abgebaut. Diese bleiben auch nach der Verdauung im Magen fast immer gefährlich für Zöliakiepatienten.

Einzelne, kleine Peptidsequenzen (Motifs) können im Sandwich-Format nicht mehr erfasst werden, da mindestens zwei Epitope für einen Sandwich-ELISA notwendig sind. Dagegen werden mit dem kompetitiven Format auch einzelne Peptidfragmente erfasst. Im RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. Nr. R7021) wird ein neues Standardmaterial verwendet. Dazu wurden Weizen, Roggen und Gerste durch Pepsin und Trypsin verdaut, die Peptidfragmente nach Proteinbestimmung gemischt und lyophilisiert. Der Proteingehalt wurde nach Dumas bestimmt.

Das Testergebnis kann daher auf die Prolaminkonzentration und somit auf die im Codex Alimentarius festgelegten Grenzwerte bezogen werden. Das Ergebnis wird in mg/kg (ppm) Gliadin angegeben. Der Hydrolysestandard wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Köhler (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie) hergestellt.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit Gliadin beschichtet. Zugegeben werden Standards (Hydrolysatgemisch aus Weizen, Roggen und Gerste) bzw. Proben und der Peroxidase gekoppelte anti-Gliadin-Antikörper (Konjugat mit monoklonalem R5-Antikörper). Freies und immobilisiertes Gliadin konkurrieren um die Gliadin-Antikörper-Bindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundener enzymmarkierter Antikörper wird anschließend in einem Waschschrift entfernt. Substrat/Chromogen wird zugegeben und inkubiert. Das gebundene Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Gliadin bzw. Prolamin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen à 8 Einzelkavitäten)
beschichtet mit Gliadin
- 5 x Standardlösungen, je 1,3 ml
0 ng/ml (Nullstandard), 10 ng/ml, 30 ng/ml, 90 ng/ml, 270 ng/ml
in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml).....roter Verschluss
Peroxidase-konjugierter Antikörper, Konzentrat
- 1 x Substrat/Chromogen (10 ml) brauner Verschluss
rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Probenpuffer (60 ml)weißer Verschluss
als 5fach Konzentrat, gelb gefärbt
- 1 x Waschpuffer (100 ml) brauner Verschluss
als 10fach Konzentrat

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzgläser mit Schraubverschluss
- Schüttler
- 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 die Extraktion von Proben wie z.B. Stärke und Sirup wird eine **Ethanol-lösung (60 %)** benötigt: z.B. 150 ml Ethanol p.a. mit 100 ml destilliertem Wasser gut vermischen
- zur Extraktion von polyphenolhaltigen Proben wie **Bier, Malz und Hopfen** muss eine **Ethanol-lösung (60 %)** hergestellt werden, **die 10 % flüssige Fischgelatine enthält**: z.B. 30 ml dest. Wasser in einen 100 ml Messzylinder füllen; 10 g flüssige Fischgelatine (Serva, Best. Nr. 22156 oder Sigma Art. Nr. G-7765, beide 45% Feststoffanteil) zugeben und gut verrühren; 60 ml Ethanol p.a. zugeben, mischen, den pH auf 8,5 einstellen und mit dest. Wasser bis 100 ml auffüllen. Die Fischgelatine löst sich nicht komplett in 60 % Ethanol. Daher die benötigte Menge für die Probenaufarbeitung unter Rühren entnehmen. Die Haltbarkeit der Fischgelatine/Ethanol Lösung ist 2 Wochen bei Raumtemperatur.
- 0,1 M Natriumhydroxydlösung

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure.

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.

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

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- eine Blaufärbung der rötlich gefärbten Substrat-/Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- eine Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

9.1. Testvorbereitungen

Luftgetragene Getreidestäube und unsaubere Laborausrüstung können zu einer Gliadinkontamination im Test führen. Daher während der Testdurchführung Handschuhe tragen und vor Beginn des Tests:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 60 % Ethanol (siehe 5.2.) reinigen
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA[®]QUICK Gliadin (Art. Nr. R7003, R7004, R7005) auf Gliadinkontamination überprüfen

9.2. Extraktion der Proben

In dem RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (R7021) können nur Proben eingesetzt werden, die mit der Ethanol-Extraktion aufgearbeitet wurden (der Cocktail (patented) sollte nicht verwendet werden).

Der **Probenpuffer** liegt als 5fach Konzentrat vor. Das benötigte Aliquot am Tag der Testdurchführung entsprechend mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 3 ml Konzentrat + 12 ml dest. Wasser, ausreichend für die Verdünnung von 10 Proben. Es ist sicherzustellen, dass der Puffer nicht mit Probenmaterial verunreinigt wird.

Eine repräsentative Menge Probe (5 - 50 g) homogenisieren.

- **Feste Lebensmittel (z.B. Stärke, Stärkesirup):** 1 g einer repräsentativen, homogenen Probe in 10 ml 60 % Ethanollösung (siehe 5.2.) aufnehmen
- **Polyphenolhaltige feste Lebensmittel (z.B. Hopfen und Malz):** 1 g einer repräsentativen, homogenen Probe in 10 ml 60 % Ethanollösung, die 10 % Fischgelatine enthält (siehe 5.2.) aufnehmen, mischen
- **Flüssige Lebensmittel (z.B. Sojasauce):** 1 ml Probe mit 9 ml 60 % Ethanollösung (siehe 5.2.) mischen
- **Bier** 1 ml Probe mit 9 ml 60 % Ethanollösung, die 10 % Fischgelatine enthält (siehe 5.2.), mischen

Weiteres Vorgehen für alle Proben

- mind. 30 sec gründlich mischen (Vortex)
- weitere 10 min über Kopf schütteln oder rotieren auf einem Rotator
- zentrifugieren: 10 min / mind. 2500 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Überstand 1:50 (1+49) mit verdünntem Probenpuffer verdünnen, (z.B. 20 µl Überstand + 980 µl verdünnter Puffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Nach dem Zentrifugationsschritt sind die Überstände in einem gut verschlossenen Gefäß bis zu vier Wochen im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Das **Antikörper-Enzymkonjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme mischen. Um die

gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 100 µl Konzentrat + 1 ml dest. Wasser ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen) gut mischen. Es ist darauf zu achten, dass das Wasser nicht mit Gliadin kontaminiert ist.

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.

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 50 µl der Standardlösung bzw. der vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl verdünnte Enzymkonjugat-Lösung (siehe 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. 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 zweimal wiederholen.
5. 100 µl Substrat-/Chromogenlösung (brauner Verschluss) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
6. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / 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.

Die Gliadinkonzentration in ng/ml, die aus der Eichkurve abgelesen wird, muss weiter mit dem Verdünnungsfaktor von 500 multipliziert werden. Dieser Faktor von 500 ist bereits in der RIDA[®]SOFT Win voreingestellt. (Beim Abweichen von der empfohlenen Verdünnung muss der weitere Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden).

Das Testergebnis wird in mg Gliadin / kg Lebensmittel angegeben. Insgesamt werden Gliadin, Secalin und Hordein vom R5 Antikörper erfasst.

Für eine weitere Umrechnung in Gluten, wird oft der Faktor 2 verwendet. Dies ist jedoch stark abhängig von der analysierten Probe, insbesondere bei Stärken (je nach Auswaschungsgrad werden Gluteline aufkonzentriert; in diesem Fall ist der Faktor größer 2 und die Glutenkonzentration entsprechend höher).

Rechenbeispiel:

Aus der Standardkurve wird eine Konzentration von 50 ng/ml (ppb) Gliadin abgelesen. Multipliziert mit dem empfohlenen Verdünnungsfaktor 500 ergibt sich ein Wert von 25000 ng/ml Gliadin entsprechend 25 mg/kg (ppm) Gliadin. Um den Glutengehalt zu berechnen, muss mit dem Faktor 2 multipliziert werden, dies ergibt 50 mg/kg (ppm) Gluten.

Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung messen
- Gluten-freie und Gluten-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen.

Ein Produkt-Informationen-Folder mit weiteren Informationen liegt bei R-Biopharm AG vor und kann dort angefordert 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® Gliadin competitive

Brief information

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) is used for the analysis of fermented and hydrolyzed food (e.g. beer, starch syrup, starch, malt extract, sourdough, soy sauce) which are declared as “gluten-free”.

The competitive enzyme immunoassay quantitates peptide fragments of prolamins from wheat (gliadins), rye (secalin) and barley (hordein). The used R5 monoclonal antibody recognizes among others the potentially toxic sequence QQPFP, which occurs repeatedly in the prolamins molecules.

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) has been validated by the AACCI and is official method ,AACCI 38-55.01‘.

All reagents required for the enzyme immunoassay are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization, extraction
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) approx. 30 min test implementation (incubation time) 40 min
Limit of detection:	1.36 mg Gliadin / kg food
Limit of quantification:	5 mg Gliadin / kg food
Standard material:	The RIDASCREEN® standard material is a hydrolysate (mixture of wheat, rye and barley).
Specificity:	The R5 monoclonal antibody recognizes potentially toxic peptide sequences of gliadins from wheat and related prolamins from rye and barley.
Cross reactivity:	No cross-reaction with soy, oats, corn, rice, millet, teff, buckwheat, quinoa and amaranth.

Related products

RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001)

RIDASCREEN®FAST Gliadin (Art. No. R7002)

RIDA®QUICK Gliadin (Art. No. R7003, R7004, R7005)

RIDA® Extraction Solution (Art. No. R7098)

Cocktail (patented) (Art. No. R7006, R7016)
Set of 3 Gliadin Assay Controls (Art. No. R7010)
Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. No. R7012)
SureFood® ALLERGEN (real time PCR) Gluten (Art. No. S3106)
SureFood® ALLERGEN QUANT (real time PCR) Gluten (Art. No. S3206)

1. Intended use

RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) is used for the analysis of fermented and hydrolyzed food (e.g. beer, starch syrup, starch, malt extract, sourdough, soy sauce) which are declared as “gluten-free”.

2. General

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common to improve e.g. texture, moisture retention and flavour. Gluten is a mixture of prolamin and glutelin proteins present in wheat, rye and barley.

Coeliac disease is a permanent intolerance to gluten that results in damage to the small intestine and is reversible when gluten is avoided by diet.

According to the Codex Alimentarius (Alinorm 08/31/26) two categories for labeling of food according to the gluten content now exist:

1. Food products which contain less than 20 mg/kg (ppm) can be labeled as "**gluten-free**".
2. Food products labeled as "**very low gluten**" can have a gluten content above 20 and up to 100 mg/kg (ppm).

The official standard method for gluten determination according to the Codex Alimentarius is an ELISA which uses the R5 antibody (Mendez); this requirement is fulfilled by the sandwich ELISA RIDASCREEN® Gliadin (Art. No. R7001, R7002) as well as by the RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021).

During food processing like e.g. fermentation or hydrolysis intact prolamin molecules are partly or completely degraded to small peptide fragments. For Coeliac patients these fragments still remain dangerous even after digestion in the stomach.

Single, small peptide sequences (motifs) cannot be detected by a sandwich ELISA format, because at least two epitopes are necessary for a sandwich ELISA. However, with a competitive format single peptide fragments can be detected. RIDASCREEN® Gliadin competitive (Art. No. R7021) contains a new standard material. For this, wheat, rye and barley were digested by pepsin and trypsin, the

peptide fragments were mixed and lyophilized after protein determination. The protein content was determined according to Dumas.

The assay can be related to the prolamin concentration and therefore to the limit values stipulated by the Codex Alimentarius. The result is expressed in mg/kg (ppm) gliadin. The hydrolyzed standard was produced by the working group of Prof. Dr. Köhler (German Research Centre for Food Chemistry).

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with gliadin. Standards (hydrolysate mixture of wheat, rye and barley), respectively sample solutions and peroxidase labeled anti-gliadin antibodies (conjugate with monoclonal R5-antibodies) are added. Free and immobilized gliadin compete for the gliadin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound enzyme conjugate is then removed by a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. Addition of the stop solution causes a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the gliadin respectively prolamin concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 96 wells (12 strips with 8 removable wells each) coated with gliadin
- 5 x Standard solutions, 1.3 ml each in aqueous solution, ready-to-use
0 ng/ml (zero standard), 10 ng/ml, 30 ng/ml, 90 ng/ml, 270 ng/ml,
in aqueous solution, ready-to-use
- 1 x Conjugate (0.7 ml) red cap
peroxidase conjugated antibody, concentrate
- 1 x Substrate/Chromogen (10 ml) brown cap
stained red
- 1 x Stop solution (14 ml) yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Sample diluent (60 ml) white cap
5x concentrate, stained yellow
- 1 x Washing buffer (100 ml) brown cap
10x concentrate

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge + centrifugal glass vials with a screw top
- shaker
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenizer
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- for the extraction of samples like starch and syrup an **ethanol solution (60 %)** is required: e.g. add 150 ml ethanol p.a. to 100 ml distilled water and shake well
- for the extraction of polyphenol containing samples like **beer, malt and hops** an **ethanol solution (60 %) containing 10 % liquid fish gelatin** is required: e.g. add 30 ml of distilled water into a 100 ml graduated cylinder; add 10 g of liquid fish gelatin (Serva, Art. No. 22156 or Sigma Art. No. G-7765, both 45% solid content) and mix well; add 60 ml ethanol p.a., mix and adjust pH to 8.5 and fill up to 100 ml with distilled water. The fish gelatin cannot be dissolved completely in 60% ethanol, therefore take the required volume for the sample preparation while stirring. The fish gelatin/ethanol solution can be stored for 2 weeks at room temperature.
- 0.1 M sodium hydroxide

6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instructions for use must be strictly followed.

The stop solution contains 1 N sulfuric acid.

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 and reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The red stained substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see 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 reddish substrate/chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for the zero standard

9. Preparation of Samples

9.1. Preliminary comments

Airborne cereal dust and used laboratory equipment may lead to gliadin contamination of the assay. Therefore, wear gloves during the assay and before starting with the assay:

- clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment with 60 % ethanol (see 5.2.)
- carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure
- check for gliadin contamination of reagents and equipment with the test strips RIDA[®]QUICK Gliadin (Art. No. R7003, R7004, R7005)

9.2. Extraction of samples

For the RIDASCREEN[®] Gliadin competitive (R7021) only samples extracted with ethanol should be tested (the Cocktail (patented) should not be used).

The **sample diluent** is provided as a concentrate (5fold). Only the amount which is actually needed should be diluted with distilled water (e. g. 3 ml concentrate + 12 ml distilled water, sufficient for the dilution of 10 samples). Make sure that the buffer is not contaminated with gliadin from the sample.

Homogenize a representative amount of food material (5 - 50 g).

- Solid food (e.g. starch and starch syrup):** weigh 1 g of a representative, homogeneous sample and add 10 ml 60 % ethanol solution (see 5.2.)
- Polyphenol-containing solid food (e.g. malt and hops):** weigh 1 g of a representative, homogeneous sample and add 10 ml 60 % ethanol solution, containing 10 % fish gelatin (see 5.2.)
- Liquid food (e.g. soy sauce):** mix 1 ml of the sample with 9 ml 60 % ethanol solution (see 5.2.)
- Beer:** mix 1 ml of the sample with 9 ml 60 % ethanol solution, containing 10 % fish gelatine (see 5.2.)

Further procedure for all samples

- mix thoroughly for at least 30 sec (vortex)
- shake well up side down or rotate on a rotator for further 10 min
- centrifuge: 10 min / at least 2500 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute the supernatant 1:50 (1+49) with diluted sample diluent (i. e. 20 µl supernatant + 980 µl diluted buffer)
- use 50 µl per well in the assay

Remark:

All supernatants obtained after centrifugation can be stored in a tightly closed vial in the dark at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) up to four weeks.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **antibody enzyme conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate (11fold). Since the diluted enzyme conjugate solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the conjugate concentrate should be shaken. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) with distilled water (e. g. 100 µl conjugate concentrate + 1 ml water, sufficient for 2 microtiter strips) mix well. Take care that the water is not contaminated with gliadin.

The **washing buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). If crystals have formed, dissolve them by placing the buffer in a

water bath at 37 °C (99 °F). The diluted buffer is stable at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for four weeks.

10.2. Test procedure

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

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 50 µl of each standard solution or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of diluted enzyme conjugate (see 10.1.) to each well, mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
5. Add 100 µl of substrate/chromogen (brown cap) 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.
6. Add 100 µl of the stop reagent to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 10 min 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.

The gliadin concentration in ng/ml is read from the standard curve and must be further multiplied by the dilution factor of 500. This factor of 500 is set by default in the RIDA®SOFT Win. (When differing from the recommended dilution, the additional dilution factor has to be taken into account).

The result is expressed in mg gliadin / kg food. Altogether, the R5 antibody detects gliadin, secalin and hordein.

For a further calculation into gluten, a factor of 2 is often used. However, this factor strongly depends on the sample analyzed, especially for starches (the higher the degree of washing the higher is the proportion of glutelins in the sample; in this case the factor is bigger than 2 and the gluten concentration accordingly higher).

Example:

From the standard curve a concentration of 50 ng/ml (ppb) gliadin is obtained. Multiplying by the recommended dilution factor 500 leads to 25000 ng/kg gliadin, corresponding to 25 mg/kg (ppm) gliadin. To calculate the gluten content, it is necessary to multiply by factor 2 which results in 50 mg/kg (ppm) gluten.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

- each sample material should be measured in duplicates
- employ also gluten free and gluten containing (spiked) samples as test controls

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

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