

RIDASCREEN[®] FAST Sesame

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Sesam

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
sesame

Art. No.: R7202

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

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

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

E-Mail:

Auftragsannahme orders@r-biopharm.de

Marketing 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.

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

Kurzinformation

RIDASCREEN®FAST Sesame (Art. Nr. R7202) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sesam bzw. Sesamanteilen in Lebensmitteln, wie Zerealien, Backwaren, Eis und Schokolade.

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:	0,24 mg/kg (ppm) Sesam entsprechend 0,000024 % Sesam
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg Sesam entsprechend 0,00025 % Sesam
Spezifität:	Der eingesetzte Antikörper reagiert spezifisch mit Sesamproteinen. Keine Kreuzreaktionen zu Cashew, Paranuss, Pekannuss, Haselnuss, Kokosnuss, Macadamia Nuss, Walnuss, Kastanie, Sonnenblumenkernen und Lima-Bohnen.

Die Spezifität des RIDASCREEN®FAST Sesame-Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Produktangebot:

bioavid Lateral Flow Sesame (Art. Nr. BL609-10/-25)

SureFood® ALLERGEN ID Sesame (Art. Nr. S3108)

SureFood® ALLERGEN QUANT Sesame (Art. Nr. S3208)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Sesame (Art. Nr. R7202) ist ein Sandwich-Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sesam bzw. Sesamanteilen (als Ingredienzien oder als Kontamination) in rohen oder erhitzten Lebensmitteln wie Zerealien, Backwaren, Eis und Schokolade.

2. Allgemeines

Sesamsamen (*Sesamum indicum*) werden roh oder geröstet als Zutaten in Backwaren, Eis, Zerealien, Schokoladen und zur Herstellung von Ölen oder Pasten (Tahina) verwendet. In der Europäischen Union, Kanada und Australien besteht eine Kennzeichnungspflicht für Sesam.

Die Sesamsamen-Allergie wird verstärkt als Gesundheitsproblem erkannt, die Symptome reichen von allergischem Hautausschlag bis zu lebensgefährlichen Anaphylaxien. Bisher konnten sieben verschiedene Proteine als Allergene in Sesam identifiziert werden (Ses i 1-7). Die einzige effektive Maßnahme um sensibilisierte Patienten vor einer Allergie zu schützen ist die strikte Vermeidung von sesamhaltigen Nahrungsmitteln.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Sesamproteine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Sesamprotein an die spezifischen Fängerantikörper und es kommt ein Antikörper-Antigen-Komplex zustande. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Nicht gebundenes Antikörperkonjugat wird in einem Waschschrift entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat und Chromogen. Das an den Antikörper gebundene Enzym 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 ist proportional zu der Sesam-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten (6 Streifen à 8 Einzelkavitäten)
beschichtet mit anti-Sesam-Antikörpern
- 5 x Standards *), je 1,3 ml
0 ppm (Nullstandard), 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm Sesam
in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (7 ml) roter Verschluss
Peroxidase-konjugierter Antikörper, gebrauchsfertig
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) brauner Verschluss
Substrat/Chromogenlösung, rötlich gefärbt
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Allergen Extraktionspuffer (125 ml) grüner Verschluss
als 10fach Konzentrat
- 1 x Waschpuffer (100 ml) brauner Verschluss
als 10fach Konzentrat

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 20, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können die Sesam-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge + zentrifugierbare Reagenzgläser
- Wasserbad
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Messpipetten
- Filterpapier
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- wenn möglich Multikanal- und/oder Multistepper-Pipette

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Magermilchpulver (MMP, Lebensmittelqualität)

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Der Waschpuffer enthält Thimerosal. Hautkontakt unbedingt vermeiden.

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

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.

Red Chromogen Pro ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

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

9. Probenvorbereitung

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) oder den gesamten Flascheninhalt auf 1250 ml auffüllen. Dem verdünnten Extraktionspuffer muss 5 g Magermilchpulver (MMP) auf 100 ml zugesetzt werden (bzw. 62,5 g auf 1250 ml). Der 1:10 verdünnte Allergen Extraktionspuffer ohne MMP-Zusatz hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen und mit MMP-Zusatz von einem Tag bei 2 - 8 °C.

9.1. Testvorbereitung

Unsaubere Laborausrüstung kann zu einer Kontamination von Proben oder Testkomponenten mit Sesam führen. Daher sollten während der Testdurchführung Handschuhe getragen und vor Beginn des Tests folgendes beachtet werden:

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung vor und nach jeder Probe sorgfältig reinigen
- Probenaufarbeitung und ELISA-Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen
- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut homogenisieren

9.2. Feste Proben

- 1 g einer repräsentativen Probe abnehmen und 20 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer mit MMP-Zusatz zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 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)
- 100 µl Probe pro Kavität im Test einsetzen

9.3. Flüssige Proben

- 1 ml einer repräsentativen Probe abnehmen und 19 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer mit MMP-Zusatz zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubieren
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 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)
- 100 µl Probe pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Weitere Verdünnungen sollten mit dem final verdünnten Allergen Extraktionspuffer mit MMP-Zusatz durchgeführt werden.

Die Probenextrakte sind bei 2 - 8 °C etwa 3 Tage haltbar. Nicht verwendete Extrakte können bei -20 °C einige Monate aufbewahrt werden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor. Das Konzentrat 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 ca. 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) verwendet werden, um eine Verzögerung und damit unterschiedliche Inkubationszeiten über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben (mind. 150 µl pro Kavität) werden

auf die unbeschichtete Platte pipettiert und 100 µl 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 Standardlösung 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 zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl Enzymkonjugat-Lösung 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 zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Red Chromogen Pro in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. 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.

Höhere Extinktionswerte ($E_{450 \text{ nm}}$) der Eichkurve im Vergleich zu den Daten lt. Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Sesam-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 Sesam-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 Sesam-Konzentrationen berücksichtigt werden.

Anmerkung:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Sesamkontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass andere proteinfreie Komponenten aus Sesam (z.B. Öle) in einer Probe enthalten sein können.

Generell:

Aufgrund der Vielzahl an Lebensmittel 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
- Sesamprotein-freie und Sesamprotein-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen

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 Sesame

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Sesame (Art. No. R7202) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sesame or parts of sesame in food like cereals, pastries, ice cream and chocolate.

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:	0.24 mg/kg (ppm) sesame corresponding to 0.000024 % sesame
Limit of quantification:	2.5 mg/kg sesame corresponding to 0.00025 % sesame
Specificity:	The antibody specifically detects proteins from sesame. No cross-reaction with cashew nut, brazil nut, pecan, hazelnut, coconut, macadamia nut, walnut, chest nut, sunflower seeds and lima beans.

The specificity of the RIDASCREEN[®]FAST Sesame test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

Related products:

bioavid Lateral Flow Sesame (Art. No. BL609-10/-25)

SureFood® ALLERGEN ID Sesame (Art. No. S3108)

SureFood® ALLERGEN QUANT Sesame (Art. No. S3208)

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Sesame (Art. No. R7202) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of sesame or parts of sesame (as ingredient components or contamination) in raw or heated food like cereals, pastries, ice cream and chocolate.

2. General

Sesame seeds (*Sesamum indicum*) are used as raw or roasted ingredients in pastries, ice cream, cereals, chocolate or for the production of oil or paste (Tahina). Labeling of sesame is mandatory in the European Union, Canada and Australia.

Sesame seed food allergy is an increasingly recognized health burden, the symptoms vary from allergic eczema to life threatening anaphylactic reactions. Until now, seven different proteins of sesame were identified as allergens (Ses i 1-7). The only effective treatment to protect sensitized patients from allergic symptoms is a strict avoidance of sesame containing food.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to sesame-protein. By adding the standard or sample solution to the wells, present sesame-protein will bind to the specific capture antibodies. The result is an antibody-antigen-complex. Components not bound by the antibodies are then removed in a washing step. 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 enzyme conjugate is then removed in a washing step. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop reagent leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the sesame concentration of the sample.

4. Reagents provided

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

- 1 x Microtiter plate with 48 wells (6 strips with 8 removable wells each)
coated with anti-sesame antibodies
- 5 x Standards ^{*)}, 1.3 ml each
0 ppm (zero standard), 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm sesame
in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (7 ml).....red cap
peroxidase conjugated antibody, ready-to-use
- 1 x Red Chromogen Pro (10 ml) brown cap
substrate/chromogen solution, stained red
- 1 x Stop solution (14 ml) yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Allergen Extraction buffer (125 ml)green cap
as a 10fold concentrate
- 1 x Washing buffer (100 ml) brown cap
as a 10fold concentrate

*) The dilution factor 20 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the sesame concentrations 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 glass vials
- water bath
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- graduated pipettes
- paper filter
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- if possible multichannel pipette and/or multistepper pipette

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- skim milk powder (SMP, food quality)

6. Warnings and precautions

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

The washing buffer contains thimerosal. Avoid skin contact.

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

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

7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Red Chromogen Pro is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiry date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the red stained Red Chromogen Pro 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

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 (e.g. 100 ml buffer concentrate + 900 ml distilled water, or alternatively use the whole content of the bottle and fill up to

1250 ml). Add 5 g skim milk powder (SMP) per 100 ml diluted Allergen Extraction buffer (respectively 62.5 g to 1250 ml). The 1:10 diluted Allergen Extraction buffer without SMP is stable for approx. twelve weeks and with SMP for one day at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

9.1. Test preparation

Unclean laboratory equipment can result in a contamination of samples or test components with sesame. Therefore, gloves should be worn during the test procedure and the following recommendations should be applied:

- thoroughly clean surfaces, glass vials, mixers and additional equipment before and after each sample
- sample extraction and ELISA-procedure should be performed in separated rooms
- thoroughly pound a representative amount of the sample (5 - 50 g), crumble and homogenize it

9.2. Solid samples

- weigh 1 g of a representative sample and add 20 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer with SMP, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 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)
- use 100 µl extract per well in the assay

9.3. Liquid samples

- take 1 ml of a representative sample and add 19 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer with SMP, close the vial, mix vigorously and incubate the solution for 10 min at 60 °C / 140 °F in a water bath
- let the sample cool down (e.g. in an ice bath) and centrifuge 10 min 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)
- use 100 µl extract per well in the assay

Remark:

Further dilutions should be prepared with the finally diluted Allergen Extraction buffer with SMP.

The sample extracts can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 3 days. Unused extracts can be stored at -20 °C (-4 °F) for several months.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The **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). Prior to dilution, dissolve eventually formed crystals by incubating the buffer in a water bath at 37 °C (99 °F). The diluted 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 three strips (24 wells) at the same 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 to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples (at least 150 µl for every well) are pipetted into the uncoated plate and then 100 µl are 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 standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard solution 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 washing buffer (see 10.1). Repeat two more times.

4. Add 100 µl of the enzyme 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 washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl Red Chromogen Pro 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 / 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 sesame 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 sesame 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 sesame concentration.

In general:

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.

Remark:

Samples tested negative could still contain a sesame contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain other protein-free sesame components (e.g. oil).

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

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

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.