

RIDASCREEN[®] FAST Soya

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Soja

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
soya

Art. No.: R7102

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

(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®FAST Soya (Art. Nr. R7102) ist ein Sandwich Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sojaproteinen in unbehandelten und prozessierten Lebensmitteln und Getränken.

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. 25 min Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 30 min
Nachweisgrenze:	0,31 mg/kg (ppm) Sojaprotein
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg (ppm) Sojaprotein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch Sojaproteine. Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Leguminosen der Tribus Phaseoleae (Bohnenartige) von 0,0017 % und zu Leguminosen der Gattung <i>Vicia faba</i> (0,0003 %). Zu anderen Leguminosen wie Erdnuss, Linse, Erbse, Lupine sowie zu Milchproteinen (Casein, β -Lactoglobulin) oder Eiproteinen besteht keine Kreuzreaktivität.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN®FAST Soya ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Sojaprotein in Lebensmitteln, wie Wurst, Eis, Schokolade, Backwaren, Backmischungen, Suppen, Saucen, Dressing, Margarine und Getränken (Saft, Wein, Bier).

2. Allgemeines

Sojaproteine können als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Mehrere Sojaproteine wurden bereits als Auslöser von Allergien identifiziert.

Nach der EU Richtlinie 2003/89/EG vom 10. November 2003, müssen Soja und Sojabestandteile auf den Lebensmitteletiketten angegeben werden. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

Sojabohnen (reife Samen, roh) bestehen zu etwa 35 % aus Proteinen. Die Sojaproteine ähneln in ihren Aminosäureanteilen tierischen Proteinen und besitzen einen hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren. Soja ist damit eine der wenigen Pflanzen, die als wertvolle Proteinquelle angesehen wird. Entsprechend wird Soja häufig als Ersatz für tierische Eiweiße verwendet (z. B. in Tofu, Sojamilch und Sojayoghurt). Daneben besitzen Sojabohnen mit etwa 20 % auch einen hohen Fettanteil, der zur Herstellung von Ölen und Fetten genutzt wird.

Die Verwendung von Soja sowohl als Nahrungsmittel als auch als Futtermittel hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. Entsprechend hat sich aber auch die Häufigkeit von Sojaallergien erhöht.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Sojaproteine beschichtet. Bei Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Sojaprotein 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 Antikörper-Antigen-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-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Sojaprotein-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-Sojaprotein-Antikörpern
- 5 x Soja Standards ^{*)}, je 1,3 ml
0 mg/kg (ppm) (Nullstandard), 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg
Sojaprotein in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugierter Antikörper, 11fach Konzentrat
- 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
- 1 x Extraktions-Lösung 2 (110 ml) blauer Verschluss
als 2fach Konzentrat

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 100, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Sojaprotein-Konzentration der Probe direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifugengläser
- Schüttler
- Wasserbad 60 °C und 100 °C
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Papierfilter

- Messpipetten
- variable 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten
- wenn möglich Multikanal- und/oder Multistep-Pipette

5.2. Reagenzien:

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Extraktions-Lösung 2 ist gesundheitsschädlich, sie enthält Mercaptoethanol. Daher sollte unter dem Abzug gearbeitet werden und Hautkontakt vermieden werden (Handschuhe tragen).

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

Der Waschpuffer enthält Thimerosal. Hautkontakt unbedingt vermeiden.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Den Testkit 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 Substrat-/Chromogenlösung 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. Der verdünnte Allergen Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C.

Die **Extraktions-Lösung 2** wird **unverdünnt** eingesetzt.

9.1. Probenextraktion

Unsaubere Laborausrüstung kann zu einer Kontamination von Proben oder Testkomponenten mit Soja führen. Daher sollten während der Testdurchführung Handschuhe getragen und vor Beginn des Testes 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) homogenisieren

feste Proben:

- 1 g abnehmen und 2,5 ml **unverdünnte** Extraktions-Lösung 2 sowie 17,5 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen
- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 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)
- die Probe 1:5 (1+4) mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer verdünnen (z. B. 100 µl Probe + 400 µl verdünnter Allergen Extraktionspuffer)
- 100 µl pro Kavität im Test einsetzen

flüssige Proben:

- 1 ml abnehmen und 2,5 ml **unverdünnte** Extraktions-Lösung 2 sowie 16,5 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und für 10 min bei 100 °C im Wasserbad kochen

- abkühlen lassen (z. B. im Eisbad), zentrifugieren für 10 min bei 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)
- die Probe 1:5 (1+4) mit final verdünntem Allergen Extraktionspuffer verdünnen
(z. B. 100 µl Probe + 400 µl final verdünnter Allergen Extraktionspuffer)
- 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.

Anmerkung:

Einige Probenmatrices können das Testergebnis beeinflussen. Bitte wenden Sie sich beim Einsatz von z.B. Buchweizenmehl, Gewürzen oder dunkler Schokolade an die R-Biopharm AG.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen ELISA

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 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.

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 verdünnte 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 rot gefärbte Substrat-/Chromogenlösung 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 (Art. Nr. Z9999), erhältlich. Die Auswertung sollte mittels cubic spline - Funktion erfolgen. Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigegeführten 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 Soja-Kontamination hinweisen.

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450 \text{ nm}}$) > Standard 5 weiter verdünnen und nochmals bestimmen. Die Proben sollten so weit verdünnt werden, dass sie im linearen Teil der Kurve abgelesen werden können.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der Verdünnungsfaktor 100. Die Sojaprotein-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 Sojaprotein-Konzentration berücksichtigt werden.

Anmerkungen:

Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, dass eine Sojaprotein-Kontamination unterhalb der Nachweisgrenze dieses Testes vorliegt oder dass prozessierte Sojaprodukte, wie Hydrolysate und Proteinisolate, in denen Sojaproteinbruchstücke vorhanden sein können, in einer Probe enthalten sein können, die im Sandwich Format nicht vollständig erfasst werden können.

Empfehlungen:

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- Sojaprotein-freie und Sojaprotein-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. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®]FAST Soya

Brief information

RIDASCREEN[®]FAST Soya (Art. No. R7102) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of soya proteins in untreated and processed food and beverages.

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. 25 min
test implementation (incubation time)..... 30 min

Limit of detection: 0.31 mg/kg (ppm) soya protein

Limit of quantification: 2.5 mg/kg (ppm) soya protein

Specificity: The antibodies specifically detect soya proteins.
There is a cross-reactivity of 0.0017 % to legumes of the tribe Phaseoleae (various species of beans) and to legumes of the genus *Vicia faba* group (0.0003 %). To other legumes like peanut, lentil, pea, lupine as well as Milk proteins (casein, β -lactoglobulin) or egg proteins no cross-reactivity is measured.

1. Intended use

RIDASCREEN®FAST Soya (Art. No. R7102) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of native and processed soya proteins in food. Such products are beverages as juice, wine, beer and food as sausages, dressings, bakery products, ice, chocolate, soup, sauce, margarine, etc.

2. General

Soya proteins can be present as an ingredient or as a contamination in raw and processed products. Several soya proteins can cause allergic reactions.

According to the EU Directive 2003/89/EG from November 10th 2003, soya and products thereof must be declared on food labels. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Soybeans (mature seeds, raw) contain approx. 35 % proteins. Soya proteins have a similar amino acid composition as proteins from animal sources and have a high percentage of essential amino acids. Therefore, soya is one of the few plants which are considered as a valuable source of proteins. Thus, soya is widely used as substitute for proteins from animal sources (e.g. in tofu, soya milk or soya yoghurt). Besides the high protein content, soya beans are also rich in fat (approx. 20 %) and are used for the productions of oils and fats.

The usage of soya as food and feed has strongly increased in the last decades, leading to an increase in allergic reactions as well.

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 soya proteins. By adding the standard or sample solution to the wells, present soya 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 solution is added after removing of 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 soya protein concentration in 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-soya protein antibodies
- 5 x Soya protein standard solutions ^{*}), 1.3 ml each
0 mg/kg (ppm) (zero standard), 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg
soya protein in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (0.7 ml)red cap
peroxidase conjugated antibody, 11x concentrate
- 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 10x concentrate
- 1 x Washing buffer (100 ml) brown cap
as a 10x concentrate
- 1 x Extraction Solution 2 (110 ml)..... blue cap
as a 2x concentrate

^{*}) The dilution factor of 100 for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the soya protein 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)
- centrifugal vials
- shaker
- water bath (60 °C / 140 °F and 100 °C / 212 °F)
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, Ultra-Turrax or homogenisator
- paper filter
- graduated pipette
- variable 20 - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes
- if possible multichannel pipette and/or multistepper pipette

5.2. Reagents:

–distilled or deionized water

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 Extraction Solution 2 is harmful to health. It contains mercaptoethanol. It should be worked under a chemical hood and skin contact should be avoided (use gloves).

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

The washing buffer contains thimerosal. Avoid skin contact.

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 red stained Substrate/Chromogen solution 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 Substrate/Chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for standard 5

9. Preparation of Samples

The **Allergen Extraction buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before dilution dissolve possibly formed crystals by heating (water bath 37 °C / 98.6 °F) and mix well. Dilute the heated concentrate 1:10 (1+9) with distilled water (e.g. 100 ml concentrate + 900 ml dist. water) or fill up the whole content of the bottle to 1250 ml. The diluted Allergen Extraction buffer can be used for approx. 12 weeks at 2 - 8 °C.

The **Extraction solution 2** is used **undiluted**.

9.1. Sample extraction

Unclean laboratory equipment can result in a contamination of samples or test components with soya. 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
- homogenize a representative amount of the sample (5 - 50 g)

Solid samples:

- weigh 1 g of sample, add 2.5 ml **undiluted** Extraction solution 2 and 17.5 ml preheated (60 °C / 140 °F) and finally diluted Allergen Extraction buffer, close the vial, mix vigorously and cook it for 10 min at 100 °C / 212 °F in a water bath
- let the sample cool down shortly (e.g. in an ice bath) and 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)
- dilute the extract 1:5 (1+4) with diluted Allergen Extraction buffer (e.g. 100 µl sample extract + 400 µl diluted Allergen Extraction buffer)
- pipette 100 µl extract per well

Liquid samples:

- take 1 ml of sample, add 2.5 ml **undiluted** Extraction solution 2 and 16.5 ml preheated (60 °C / 140 °F) and diluted Allergen Extraction buffer, close the vial, mix vigorously and cook it for 10 min at 100 °C / 212 °F in a water bath
- let the sample cool down shortly (e.g. in an ice bath) and 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)

- dilute the extract 1:5 (1+4) with diluted Allergen Extraction buffer (e.g. 100 µl sample extract + 400 µl diluted Allergen Extraction buffer)
- pipette 100 µl extract per well

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.

Remark:

Some sample matrices could influence the test result. Please do not hesitate to contact R-Biopharm AG if using e.g. buckwheat flour, spices or dark chocolate.

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

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 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 a time.

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 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.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µl of the diluted 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 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 addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), 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 soya contamination.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 5. The samples should be diluted so that the results can be read in the linear part of the calibration curve.

Please note:

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 100. The soya protein 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 soya protein concentration.

Remarks:

Samples tested negative still could contain a soya contamination below the limit of detection of the assay, or they might contain processed soya products like hydrolysates or proteinisolates for example which can contain protein fragments which are not further measurable in the sandwich format.

Recommendation:

In order to ensure a high analytical performance:

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

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. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. 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.