

RIDASCREEN[®] FAST Soya

Art. No. R7102

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Sojaproteinen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
soya proteins

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 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
Kalibrator:	Sojaprotein (Sojamehl mit 39 % Sojaprotein)
Nachweisgrenze:	0,24 mg/kg (ppm) Sojaprotein
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg (ppm) Sojaprotein
Spezifität:	Die eingesetzten Antikörper erkennen spezifisch erhitzte Sojaproteine. (Die Probenextraktion bei 100 °C für 10 min stellt sicher, dass alle Sojaproteine denaturieren und im ELISA erfasst werden). Es besteht eine Kreuzreaktivität zu Leguminosen der Tribus Phaseoleae (z.B. Bohnen), der Gattung <i>Vicia</i> (z.B. Ackerbohne), zu getrockneten Erbsen bzw. Erbsenmehl und zu Erdnuss.

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

RIDA[®]QUICK Soya (Art.Nr. R7103)

Set of 3 processed Soya Assay Controls (Art.Nr. R7132)

SureFood[®] ALLERGEN ID 4plex Soya/Celery/Mustard + IAC (Art.Nr. S3401)

SureFood[®] ALLERGEN ID Soya (Art.Nr. S3101)

SureFood[®] ALLERGEN QUANT Soya (Art.Nr. S3201)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN[®]FAST Soya (Art. Nr. R7102) ist ein Sandwich-Enzym-immunoassay zur quantitativen Bestimmung von nativem und prozessiertem Sojaprotein in Lebensmitteln. Unter anderem in Getränken oder in Lebensmitteln, wie Wurst, Dressings, Backwaren, Eis, Schokolade, Suppen, Saucen, Margarine usw.

2. Allgemeines

Sojaproteine können als Inhaltsstoff oder als Kontamination in rohen und verarbeiteten Lebensmitteln vorhanden sein. Nach **Verordnung (EU) Nr. 1169/2011** muss Soja als Auslöser von Lebensmittelallergien auf dem Etikett von Lebensmitteln aufgeführt sein. Vergleichbare gesetzliche Regelungen gibt es u. a. in den USA, Kanada, Australien und Neuseeland.

Sojabohnen (reife Samen, roh) bestehen zu etwa 35 % aus Proteinen. Häufig wird Soja als Ersatz für tierische Eiweiße verwendet (z.B. in Tofu, Sojamilch und Sojajoghurt). 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.

3. Testprinzip

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen Antikörpern gegen Soja-Proteine beschichtet.

Bei Zugabe von Standard bzw. Probe bindet vorhandenes Soja-Protein an die spezifischen Antikörper. In einem Waschschrift werden nicht gebundene Anteile entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers. Das Antikörperkonjugat bindet an den Ak-Ag-Komplex. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich) Komplex. Nicht gebundenes Konjugat wird nachfolgend durch Waschen entfernt. Der Nachweis von Soja-Protein erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Das Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion ist proportional zu der Soja-Protein Konzentration in der Probe. Das Ergebnis wird in mg/kg Soja-Protein angegeben.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		48 Kavitäten
4 x Extractor 3 4 x Extraktor 3	braun	gebrauchsfertig		30 ml
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	2,5 mg/kg	1,3 ml
Standard 3* Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	5,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 4* Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	10,0 mg/kg	1,3 ml
Standard 5* Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	20,0 mg/kg	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	0,7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		10 ml
Stop Solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den **Verdünnungsfaktor 100**, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So kann die Sojaprotein-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
- 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
- für die Probenaufarbeitung von tannin- und polyphenolhaltigen Lebensmitteln: Casein (z.B. Sigma C5890) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) K15 oder K17 (z.B. AppliChem A2258)

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.

Das 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 rötlichen Substrat-/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 5
- geruchloser Extractor 3 nach mehrmaligem Öffnen der Flasche; Extractor 3 sollte nach Mercaptoethanol (verdorbene Eier) riechen. (Zum Überprüfen vorsichtig Dämpfe der geöffneten Flasche zufächern).

9. Probenvorbereitung

Arbeitsgeräte, wie z. B. Schlagmühle, Glasgefäße oder Spatel müssen vor und nach jeder Probe gründlich gereinigt werden, um Allergenreste zu entfernen und Kontamination zu vermeiden.

Der **Allergen Extraktionspuffer** liegt als **10fach Konzentrat** vor. Vor der Verdünnung des Konzentrates evtl. gebildete Kristalle durch Erwärmen lösen (Wasserbad 37 °C) und gut mischen. Anschließend das erwärmte Konzentrat 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 100 ml Konzentrat + 900 ml dest. Wasser). Der verdünnte Allergen Extraktionspuffer hat eine Haltbarkeit von ca. 12 Wochen bei 2 - 8 °C. Es wird empfohlen unter einem Abzug zu arbeiten, da der Extraktor 3 β -Mercaptoethanol enthält. Der pH-Wert der Proben sollte neutral sein.

9.1. Probenaufarbeitung feste Proben (**ohne** Casein)

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g Probe abnehmen und 2,5 ml Extraktor 3 sowie 17,5 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und **10 min bei 100 °C** ins kochende Wasserbad stellen (das gesamte Probenröhrchen sollte von kochendem Wasser bedeckt sein)
- Probe 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

9.2. Probenaufarbeitung flüssige Proben (**ohne** Casein)

- 1 ml Probe abnehmen und 2,5 ml Extraktor 3 sowie 16,5 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten Allergen Extraktionspuffer zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und **10 min bei 100 °C** ins kochende Wasserbad stellen (das gesamte Probenröhrchen sollte von kochendem Wasser bedeckt sein)
- kurz 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

9.3. Probenaufarbeitung tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel, wie Gewürze, Schokolade, Kaffee (**mit** Casein und PVP)

Dem final verdünnten Allergen Extraktionspuffer (AEP) wird 0,25 % Casein und 1 % PVP zugesetzt, um Sojaproteine aus verschiedenen Gewürzen, Schokolade und anderen polyphenolhaltigen Matrices (siehe Validierungsergebnisse, erhältlich bei R-Biopharm AG) zu extrahieren. Die Komponenten lösen sich besser, wenn der Allergen Extraktionspuffer auf 60 °C vorgewärmt wurde.

- eine repräsentative Menge der Probe (5 - 50 g) homogenisieren
- 1 g Probe abnehmen und 2,5 ml Extraktor 3 sowie 17,5 ml vorgewärmten (60 °C) und final verdünnten AEP (mit 0,25 % Casein und 1 % PVP) zugeben, Gefäß verschließen, gut mischen und **10 min bei 100 °C** ins kochende Wasserbad stellen (das gesamte Probenröhrchen sollte von kochendem Wasser bedeckt sein)
- kurz 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

Der verdünnte Casein/PVP-Extraktionspuffer ist bei 2 - 8 °C etwa 7 Tage haltbar. 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 vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Das **Konjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als 11fach Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat-Konzentrat verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat-Konzentrat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit dest. Wasser verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2 ml dest. Wasser, ausreichend für 2 Mikrotiterstreifen).

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von vier Wochen bei 2 - 8 °C.

10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

Pro Testansatz sollten nicht mehr als drei Mikrotiterstreifen (24 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als drei Streifen sollte eine zweite unbeschichtete Platte (z.B. low binding von Greiner bio-one Kat.-Nr. 655101) als Vorplatte verwendet werden, um eine Zeitverzögerung über die Platte zu vermeiden. Alle Standards und Proben werden auf die unbeschichtete Platte pipettiert (mind. 150 µl pro Kavität) und werden dann zügig mit einer 8-Kanal Pipette auf die beschichtete Platte transferiert.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 100 µl des Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Duplikate in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.

3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. Je 100 µl verdünntes Konjugat zu allen Kavitäten geben, vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 10 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 10 min nach Zugabe des Stopp Lösung 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. Zur Qualitätskontrolle sollten die Testkontrollen (R7132) benutzt werden.

Höhere Extinktionswerte ($E_{450\text{ nm}}$) der Standardkurve im Vergleich zu den Daten lt. Zertifikat, insbesondere für den Null-Standard, können auf ungenügendes Waschen oder eine Allergen-Kontamination hinweisen.

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

Bitte beachten:

Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt der **Verdünnungsfaktor 100**. Die Allergen-Konzentration kann direkt aus der Standardkurve abgelesen werden - der Probenverdünnungsfaktor 100 wurde bei den Konzentrationsangaben der Standards bereits berücksichtigt (siehe 4.*).

Bei Probenverdünnungen von mehr als 1:100 muss der weitere Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Sojaprotein-Konzentration berücksichtigt werden.

Wenn z.B. auf 1 % Sojamehl (entspricht 10000 mg/kg Sojamehl bzw. ca. 3900 mg/kg Sojaprotein) untersucht wird, dann muss die Probe 1:70000 verdünnt werden (1:100 gemäß Probenaufarbeitung und zusätzlich 1:700 mit Allergen Extraktionspuffer).

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.

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.

Empfehlungen

Um eine hohe analytische Sicherheit zu gewährleisten, empfehlen wir:

- jede Probe als Doppelbestimmung zu analysieren
- Bei extrem sauren oder basischen Proben sollte der pH-Wert auf neutral eingestellt werden.
- allergen-freie und allergen-haltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitzuführen
- 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.

Weitere Applikationen

- ELISA – Wischtest Allergene
- Probenaufarbeitung für Caseinate

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 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

Kalibrator: soya protein (soya flour with 39 % soya protein)

Limit of detection: 0.24 mg/kg (ppm) soya protein

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

Specificity: The antibodies specifically detect heated soya proteins.
(The sample extraction at **100 °C for 10 min** ensures that all soya proteins denature and can be detected in the ELISA).

There is a cross-reactivity to legumes of the tribe Phaseoleae (e.g. beans), the genus *Vicia* (e.g. fava bean), to dried peas / pea flour and to peanut.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour).

In a composed / processed food (e.g. corn bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

Related products

RIDA[®]QUICK Soya (Art.No. R7103)

Set of 3 processed Soya Assay Controls (Art.No. R7132)

SureFood[®] ALLERGEN ID 4plex Soya/Celery/Mustard + IAC (Art.No. S3401)

SureFood[®] ALLERGEN ID Soya (Art.No. S3101)

SureFood[®] ALLERGEN QUANT Soya (Art.No. S3201)

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 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. According to the **regulation (EU) No. 1169/2011**, soya must be declared on food labels as it can induce allergic reactions. Similar regulations exist e.g. in the USA, Canada, Australia and New Zealand.

Soybeans (mature seeds, raw) contain approx. 35 % proteins. 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.

3. Test principle

The wells of the microtiter strips are coated with specific antibodies to soya proteins. By adding standards and samples to the wells, any soya protein present will bind to the specific antibodies. In a washing step components not bound are removed. Then antibody conjugated to peroxidase is added. This antibody conjugate is bound to the Ab-Ag-complex. An antibody-antigen-antibody (sandwich) complex is formed. Any unbound conjugate is then removed in a washing step. The detection of soya protein takes place by adding Substrate/Chromogen. The enzyme conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorbance is proportional to the soya proteins concentration of the sample. The result is expressed in mg/kg soya proteins.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		48 wells
4 x Extractor 3	Brown	Ready to use		30 ml
Allergen extraction buffer	Green	Concentrate	10x	100 ml
Standard 1*	Transparent	Ready to use	0 mg/kg	1.3 ml
Standard 2*	Transparent	Ready to use	2.5 mg/kg	1.3 ml
Standard 3*	Transparent	Ready to use	5.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 4*	Transparent	Ready to use	10.0 mg/kg	1.3 ml
Standard 5*	Transparent	Ready to use	20.0 mg/kg	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	0.7 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*) The **dilution factor of 100** for the sample has already been considered when labeling. Therefore, the 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)
- centrifuge, 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 multistep pipette

5.2. Reagents:

- distilled or deionized water
- for the sample preparation of tannin and polyphenol containing food: casein (e.g. Sigma C5890) and polyvinylpyrrolidon (PVP) K15 or K17 (e.g. AppliChem A2258)

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).

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
- odorless Extractor 3 after repeated opening of the bottle; Extractor 3 should smell like mercaptoethanol (rotten eggs). (For checking, carefully fan the vapor of the open bottle).

9. Preparation of Samples

Working devices such as mill, glass vials or spatulas must be cleaned before and after each sample preparation to remove any remains of allergen and to avoid contamination.

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). The diluted Allergen Extraction Buffer can be used for approx. 12 weeks at 2 - 8 °C (35.6 – 46.4 °F). It is recommended to work under a chemical hood, because of β -mercaptoethanol in the Extractor 3. The pH of the samples should be set to a neutral value.

9.1. Extraction solid samples (**without** Casein)

- homogenize a representative amount of sample (5 – 50 g)
- weigh 1 g of the homogenized sample, add 2.5 ml Extractor 3 and 17.5 ml preheated (60 °C / 140 °F) and diluted Allergen Extraction Buffer, close the vial, mix vigorously and put the solution for **10 min at 100 °C / 212 °F** in a boiling water bath (the entire sample tube should be covered with boiling water)
- 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 μ l sample extract + 400 μ l diluted Allergen Extraction Buffer)
- use 100 μ l extract per well in the assay

9.2. Extraction liquid samples (**without** Casein)

- take 1 ml of the homogenized sample, add 2.5 ml Extractor 3 and 16.5 ml preheated (60 °C / 140 °F) and diluted Allergen Extraction Buffer, close the vial,

- mix vigorously and put the solution for **10 min at 100 °C / 212 °F** in a boiling water bath (the entire sample tube should be covered with boiling water)
- 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)
- use 100 µl extract per well in the assay

9.3. Extraction of tannin and polyphenol containing food like spices, chocolate and coffee (**with** Casein and PVP)

To the finally diluted Allergen Extraction Buffer (AEB), add 0.25 % casein and 1 % PVP, this aids extracting soy proteins from different spices, chocolate and other polyphenol containing matrices (see validation data, available at R-Biopharm). Components are better soluble if the solution is preliminarily heated to 60°C / 140 °F.

- homogenize a representative amount of sample (5 – 50 g)
- weigh 1 g of the homogenized sample, add 2.5 ml Extractor 3 and 17.5 ml preheated (60 °C / 140 °F) and diluted AEB (containing 0.25 % casein and 1 % PVP), close the vial, mix vigorously and put it for **10 min at 100 °C / 212 °F** in a boiling water bath (the entire sample tube should be covered with boiling water)
- 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)
- use 100 µl extract per well in the assay

The diluted Casein/PVP-Extraction Buffer can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) for 7 days. 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.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **conjugate** (bottle with red cap) is provided as a 11fold concentrate. Since the diluted 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 **wash 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 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 as a pre-plate to avoid a time shift over the microtiter plate. All standards and samples are pipetted into the uncoated plate (at least 150 µl per well) and then quickly transferred to the coated microtiter plate with an 8-channel pipette.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standard and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µl of the diluted conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 10 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl 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 / 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. For quality assurance Soya Assay Controls (R7132) should be used.

In comparison with the certificate, higher values of the absorbance ($A_{450\text{ nm}}$) for the standard curve, especially for the zero standard, may be a result of insufficient washing or allergen contamination.

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

Please note

When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is 100. The allergen concentration can be read directly from the standard curve - the sample dilution factor of 100 is already taken into account for the standard concentrations (see 4. *).

For sample dilutions of more than 1:100 the further dilution factor must be considered for the calculation of the soya protein concentration.

E.g. if a sample is tested for 1 % soya flour concentration (corresponding to 10000 mg/kg soya flour or approx. 3900 mg/kg soya protein), the sample has to be diluted 1:70000 (1:100 according to the sample preparation and additional 1:700 with Allergen Extraction Buffer).

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.

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 would recommend:

- to analyze each sample material should in duplicates
- to use also allergen-free and allergen- containing (spiked) samples as test controls
- due to the multitude of food types, matrix effects cannot be excluded. To ensure an accurate result spike experiments are recommended
- 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 product information folder with further information is available on request from your local distributor or R-Biopharm AG.

Further application notes

- ELISA - Swabbing Allergens
- Sample preparation caseinates

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