

RIDASCREEN[®] Gliadin

Art. Nr. R7001

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Gliadinen und verwandten Prolaminen

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of gliadins and corresponding prolamins



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® Gliadin (R7001) ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaminen aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) in glutenfrei deklarierten Lebensmitteln.

Der R5 ELISA RIDASCREEN® Gliadin ist

- eingestuft als AOAC-OMA (2012.01) und AACCI 38.50.01
- zertifiziert bei AOAC-RI (120601)
- Codex Alimentarius Methode (Typ I)

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

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung:	homogenisieren und extrahieren
Standardmaterial:	Das RIDASCREEN® Standardmaterial ist auf den Standard der Prolamin Working Group kalibriert.
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 2 h Testdurchführung (Inkubationszeit) 1,5 h
Nachweisgrenze:	0,5 mg/kg (ppm) Gliadin bzw. 1 mg/kg (ppm) Gluten (abhängig von der Matrix)
Bestimmungsgrenze:	2,5 mg/kg (ppm) Gliadin bzw. 5 mg/kg (ppm) Gluten
Spezifität:	Der eingesetzte monoklonale Antikörper R5 erkennt die Gliadinfraktionen aus Weizen und verwandte Prolamine aus Roggen und Gerste.

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

RIDASCREEN®FAST Gliadin (R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021)

Cocktail (patented) (R7006/R7016)

RIDA® Extraction Solution (colorless) (R7098)

Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (R7012)

RIDA®QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)

SureFood® Allergen QUANT Gluten (S3206)

SureFood® Allergen Gluten (S3106)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Gliadin ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Kontaminationen durch Prolamine aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) in Rohware wie Mehl (Buchweizen, Reis, Mais, Hafer, Teff) und Gewürzen sowie in prozessierten Lebensmitteln wie Nudeln, Fertiggerichten, Backwaren, Wurst, Getränken und Eiscreme.

Alle Proben sollten mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016, offizielle R5-Mendez Methode) aufgearbeitet werden.

2. Allgemeines

Weizenmehl und Gluten werden häufig aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften als Kleber- und Streckungsmittel bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln eingesetzt. Als Gluten bezeichnet man das Eiweißgemisch aus Prolaminen und Glutelinen, welches in Weizen, Roggen und Gerste vorkommt. Zöliakie ist eine permanente Glutenunverträglichkeit, die zu einer Schädigung des Dünndarms führt. Die Symptome sind bei einer glutenfreien Diät reversibel.

Nach dem Codex Alimentarius (CODEX STAN 118-1979) gibt es nun zwei "Stufen" für die Bezeichnung von Lebensmitteln hinsichtlich ihres Glutengehaltes:

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

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

Der Grenzwert von 20 mg/kg Gluten wurde in viele nationale Gesetzgebungen übertragen.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit spezifischen R5 Antikörpern gegen Gliadine beschichtet. Durch Zugabe von Standard oder Probe bindet vorhandenes Gliadin an die spezifischen Fängerantikörper. Das Ergebnis ist ein Antikörper-Antigen-Komplex. Nicht gebundene Anteile werden in einem Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des Peroxidase-gekoppelten R5 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 farblose 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 Gliadin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Buffer Puffer	weiß	Konzentrat	5x	60 ml
Standard 1 Standard 1	transparent	gebrauchsfertig	0 ng / ml Gliadin	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	transparent	gebrauchsfertig	5 ng / ml Gliadin	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	transparent	gebrauchsfertig	10 ng / ml Gliadin	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	transparent	gebrauchsfertig	20 ng / ml Gliadin	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	transparent	gebrauchsfertig	40 ng / ml Gliadin	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	transparent	gebrauchsfertig	80 ng / ml Gliadin	1,3 ml
Wash buffer Waschpuffer	braun	Konzentrat	10x	100 ml
Conjugate Konjugat	rot	Konzentrat	11x	1,2 ml
Substrate Substrat	grün	gebrauchsfertig		7 ml

Chromogen Chromogen	blau	gebrauchsfertig		7 ml
Stop Solution Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		14 ml

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge, zentrifugierbare Reagenzröhrchen (z.B. Brand 10742512)
- Schüttler
- Schlagmühle, Mörser, Ultra-Turrax oder Homogenisator
- Wasserbad (50 °C)
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- gluten-freies **Magermilchpulver** (Lebensmittelqualität)
- **Cocktail (patented)** (R7006/R7016, 105 ml/1000 ml) und **Ethanollösung (80 %)**: d.h. 120 ml Ethanol p.a. mit 30 ml destilliertem Wasser gut mischen

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieser Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite www.r-biopharm.de.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Die farblose Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- eine Blaufärbung der Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- eine Extinktion kleiner 0,8 ($E_{450\text{ nm}} < 0,8$) für Standard 6

9. Probenvorbereitung

9.1. Testvorbereitungen

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

- Oberflächen, Glasgefäße, Schlagmühlen und weitere Ausrüstung mit 40 % Ethanol oder 2-Propanol (siehe 5.2.) reinigen
- Probenaufarbeitung und ELISA Testdurchführung in getrennten Räumen durchführen
- Reagenzien und Gerätschaften mit den Teststreifen RIDA[®]QUICK Gliadin (R7003 / R7004 / R7005) auf Gliadinkontamination überprüfen
- es wird empfohlen **unter einem Abzug** zu arbeiten, da der Cocktail (patented) β -Mercaptoethanol enthält
- β -Mercaptoethanol kann im ELISA stören, deshalb die Proben **mindestens 1:500** verdünnen (Empfehlung 1:500 für Proben mit ca. 20 mg/kg Gluten und 1:2500 für Proben mit ca. 100 mg/kg Gluten)

9.2. Extraktion mit Cocktail (patented) (R7006 / R7016, offizielle AOAC-Methode)

Eine ausreichend große Menge der Probe (mind. 5 g bzw. 5 ml) gut homogenisieren (sorgfältig zerstoßen, fein zermahlen und gut mischen bzw. die Lösung gut mischen).

- flüssige Lebensmittel:** zu 0,25 ml der homogenisierten Probe 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen

- **sonstige Lebensmittel (z.B. soja- und quinoahaltige Lebensmittel):** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- **tannin- und polyphenolhaltige Lebensmittel (z.B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Kastanienmehl, Buchweizen, Hirse und Gewürzen):** 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen, 0,25 g Magermilchpulver und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- **Fleisch- und Wurstwaren:** die Gliadinverteilung kann in diesen Lebensmitteln sehr ungleich sein, deshalb 50 g Probe einwiegen und homogenisieren: 0,25 g der homogenisierten Probe einwiegen und 2,5 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen
- **Haferproben:** die Gliadinverteilung kann sehr ungleich sein, zusätzlich sind diese Proben schwer zu homogenisieren. Deshalb 200 g Probe homogenisieren, die Probenaufarbeitung sollte dann mindestens mit dem vierfachen Ansatz durchgeführt werden: 1 g der homogenisierten Probe einwiegen und 10 ml Cocktail (patented) hinzugeben, Gefäß verschließen und gut mischen.

Bitte alle Proben wie im Folgenden beschrieben weiter extrahieren:

- 40 min bei 50 °C inkubieren
- Probe abkühlen lassen und anschließend mit 7,5 ml 80 % Ethanol (siehe 5.2.) versetzen (bei Haferproben: 30 ml 80 % Ethanol)
- Gefäß verschließen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) über Kopf schütteln oder mittels Rotator rotieren lassen
- zentrifugieren: 10 min, mind. 2500 g, bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) und/oder filtrieren (alternativ 2 ml des Extraktes in ein Reaktionsgefäß überführen und in einer Mikrozentrifuge für 10 min hochtourig zentrifugieren)
- den Überstand in ein verschließbares Röhrchen überführen
- die Probe 1:12,5 (1+11,5 / 80 µl + 920 µl) mit verdünntem Puffer (siehe 10.1.) weiter verdünnen: der finale Verdünnungsfaktor ist 500
- 100 µl pro Kavität **sofort** im Test einsetzen

Anmerkung:

Der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt bzw. das Filtrat ist in einem gut verschlossenen Gefäß bis zu acht Wochen im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Der **Puffer** liegt als 5fach Konzentrat vor. Das benötigte Aliquot am Tag der Testdurchführung 1:5 (1+4) mit dest. Wasser verdünnen (z. B. 3 ml Konzentrat + 12 ml dest. Wasser, ausreichend für die Verdünnung von 10 Proben). Es ist sicherzustellen, dass der Puffer nicht mit Gliadin verunreinigt wird.

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). Es ist darauf zu achten, dass das Wasser nicht mit Gliadin kontaminiert ist.

Der **Waschpuffer** liegt als 10fach Konzentrat vor und muss vor Gebrauch 1:10 (1+9) mit dest. Wasser verdünnt werden (z. B. 100 ml Pufferkonzentrat + 900 ml dest. Wasser). Vor dem Verdünnen darauf achten, dass evtl. gebildete Kristalle vollständig durch Erwärmen im Wasserbad bei 37 °C gelöst werden. Der verdünnte Puffer hat eine Haltbarkeit von vier Wochen bei 20 - 25 °C.

10.2. Testdurchführung

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

Pro Testansatz sollten nicht mehr als sechs Mikrotiterstreifen (48 Kavitäten) verwendet werden. Bei mehr als sechs 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 der Standardlösung bzw. der vorbereiteten Proben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und 30 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 (siehe 10.1.) in die entsprechenden Kavitäten pipettieren und weitere 30 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 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 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 30 min nach Zugabe der 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 Qualitätssicherung wird der Einsatz von Gliadin Testkontrollen (R7012) empfohlen.

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

Proben mit Extinktionswerten ($E_{450\text{ nm}}$) > Standard 6 weiter verdünnen und nochmals bestimmen.

Die Gliadinkonzentration in ng/ml (ppb), die aus der RIDA®SOFT Win Standardkurve abgelesen wird, muss weiter mit dem Verdünnungsfaktor von

mindestens 500 multipliziert werden. Dieses Ergebnis wird dann noch mit 2 multipliziert, um die Glutenkonzentration zu erhalten (Gluten besteht zu 50 % aus Gliadin, Codex Definition). Bei der RIDA[®]SOFT Win (ab Version 1.93) werden die Ergebnisse in Gliadin und Gluten angezeigt.

Die Absorption einer Probe entspricht einer Konzentration von 10 ng/ml Gliadin in der Standardkurve. Multipliziert mit dem empfohlenen Verdünnungsfaktor 500 ergibt sich ein Wert von 5000 ng/ml entsprechend 5 mg/kg (ppm) Gliadin bzw. 0,0005 % Gliadin. Um den Glutengehalt zu berechnen, muss mit dem Faktor 2 multipliziert werden, dies ergibt 10 mg/kg Gluten (0,001 % Gluten). Die Probe ist deshalb als „glutenfrei“ zu bezeichnen, da die Konzentration unterhalb von 20 mg/kg liegt.

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:

- jede Probe als Doppelbestimmung analysieren
- glutenfreie und glutenhaltige (dotierte) Proben als Testkontrollen mitführen
- zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung Spike Versuche durchzuführen
- Ergebnisse mit PCR (z.B. mit SureFood[®] Allergen QUANT Gluten, Art.Nr. S3201) bestätigen
- Bei der Herstellung von Lebensmittel wie z.B. Bier und Sauerteig werden Proteine fragmentiert. Im Sandwich ELISA ist die Wiederfindung für fragmentierte Proteine vermindert, daher sollten diese Proben mit einem

kompetitiven ELISA Testsystem, wie dem RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021), analysiert werden.

–Bei einer Analyse mittels ChemWell® oder GEMINI Automaten wenden Sie sich für weitere Informationen bitte an info@r-biopharm.de.

Weitere Applikationen:

- Probenaufarbeitung für prozessierte Lebensmittel mit der RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. Nr. R7098) - **nur nach Validierung**
- Probenaufarbeitung für Rohwaren mit Ethanol
- Probenaufarbeitung für polyphenolhaltige Rohwaren (z.B. Schokolade, Kaffee, Kakao, Buchweizen) mit Fischgelatine und Ethanol

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie bitte info@r-biopharm.de.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

RIDASCREEN[®] Gliadin

Brief information

RIDASCREEN[®] Gliadin (R7001) is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of prolamins from wheat (gliadin), rye (secalin) and barley (hordein) in as gluten-free declared food.

The R5 ELISA RIDASCREEN[®] Gliadin is
–accepted as AOAC-OMA (2012.01) and AACCI 38.50.01
–certified at AOAC-RI (120601)
–Codex Alimentarius Method (Type I)

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards).

A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	homogenization and extraction
Standard material:	The RIDASCREEN [®] standard material is calibrated to the standard of the Prolamin Working Group.
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) approx. 2 h test implementation (incubation time) 1.5 h
Limit of detection:	0.5 mg/kg (ppm) gliadin or to 1 mg/kg (ppm) gluten (depending on matrix)
Limit of quantification:	2.5 mg/kg (ppm) gliadin or to 5 mg/kg (ppm) gluten
Specificity:	The monoclonal antibody R5 reacts with the gliadin-fractions from wheat and corresponding prolamins from rye and barley.

Cross reactivities of the used antibodies have been determined for the pure food (e.g. corn flour). In a composed / processed food (e.g. maize bread) cross reactivities might be different. Interfering substances (e.g. polyphenols) can be detected by spike experiments.

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

Related products

RIDASCREEN®FAST Gliadin (R7002)

RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021)

Cocktail (patented) (R7006/R7016)

RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098)

Set of 3 processed Gliadin Assay Controls (Art. No. R7012)

RIDA®QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)

SureFood® Allergen QUANT Gluten (S3206)

SureFood® Allergen Gluten (S3106)

1. Intended use

RIDASCREEN® Gliadin is a sandwich enzyme immunoassay for the quantitative analysis of contaminations by prolamins from wheat (gliadin), rye (secalin), and barley (hordein) in raw products like flours (buckwheat, rice, corn, oats, teff) and spices as well as in processed food like noodles, ready-to-serve meals, bakery products, sausages, beverages and ice cream.

All samples should be extracted with the Cocktail (patented) (R7006/R7016, official R5-Mendez method).

2. General

The use of wheat flour and gluten in foodstuffs is extremely common because of their heat stability and useful effects on e.g. texture, moisture retention and flavour. Gluten is a mixture of prolamin and glutelin proteins present in wheat, rye and barley.

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

According to the Codex Alimentarius (CODEX STAN 118/1979) two categories for labeling of food according to the gluten content now exist:

1.) Food products which contain less than 20 mg/kg can be labeled as "**gluten-free**".

2.) Food products labeled as "**very low gluten**" can have a gluten content above 20 and up to 100 mg/kg.

The threshold of 20 mg/kg has been adopted by many national legislations in many countries.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The wells of the microtiter strips are coated with specific R5 antibodies against gliadins. By adding the standard or sample solution to the wells, present gliadin 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 R5 antibody conjugated to peroxidase is added. This 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. Enzyme substrate and chromogen are added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the colorless 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 gliadin concentration of the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Buffer	White	Concentrate	5x	60 ml
Standard 1	Transparent	Ready to use	0 ng / ml gliadin	1.3 ml
Standard 2	Transparent	Ready to use	5 ng / ml gliadin	1.3 ml
Standard 3	Transparent	Ready to use	10 ng / ml gliadin	1.3 ml
Standard 4	Transparent	Ready to use	20 ng / ml gliadin	1.3 ml
Standard 5	Transparent	Ready to use	40 ng / ml gliadin	1.3 ml
Standard 6	Transparent	Ready to use	80 ng / ml gliadin	1.3 ml
Wash buffer	Brown	Concentrate	10x	100 ml
Conjugate	Red	Concentrate	11x	1.2 ml
Substrate	Green	Ready to use		7 ml
Chromogen	Blue	Ready to use		7 ml
Stop Solution	Yellow	Ready to use		14 ml

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge, centrifugal vials (e.g. Brand 10742512)
- shaker
- laboratory mincer / grinder, pestle and mortar, ultra-turrax or homogenizer
- water bath (50 °C / 122 °F)
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents

- distilled or deionized water
- gluten-free **skim milk powder** (food quality)
- **Cocktail (patented)** (R7006 / R7016, 105 ml / 1000ml) and **ethanol solution (80 %)**: i.e. add 120 ml ethanol p.a. to 30 ml distilled water and shake well

6. Warnings and precautions for the users

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

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

7. Storage instructions

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

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

The colorless chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after expiry of the kit (see kit label).

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

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the chromogen solution prior to test implementation
- a value of less than 0.8 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) for standard 6

9. Preparation of Samples

9.1. Preliminary comments

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

- clean surfaces, glass vials, mincers and other equipment with 40 % ethanol or 2-propanol (see 5.2.)
- carry out the sample preparation in a room isolated from the ELISA procedure
- check for gliadin contamination of reagents and equipment with the test strips RIDA[®]QUICK Gliadin (R7003/R7004/R7005)
- it is recommended to work **under a chemical hood**, because of β -mercaptoethanol in the Cocktail (patented)
- β -mercaptoethanol can disturb the ELISA, therefore dilute the samples **at least 1:500** (recommendation 1:500 for samples with approx. 20 mg/kg gluten and 1:2500 for samples with approx. 100 mg/kg gluten).

9.2. Extraction with the Cocktail (patented) (R7006 / R7016, official AOAC method)

Homogenize well a sufficient amount (at least 5 g or 5 ml) of sample (grind it thoroughly to powder and mix well or mix well the solution respectively).

- liquid food samples:** use 0.25 ml of the homogenized sample and add 2.5 ml of the Cocktail (patented), close the vial and mix well
- other food samples (e.g. soy and quinoa containing samples):** weigh 0.25 g of the homogenized sample and add 2.5 ml of the Cocktail (patented), close the vial and mix well
- tannin and polyphenol containing food samples (e.g. chocolate, coffee, cocoa, chestnut flour, buckwheat, millet and spices):** weigh 0.25 g of the homogenized sample, add 0.25 g of skimmed milk powder and add 2.5 ml of the Cocktail (patented), close the vial and mix well
- meat and sausages:** in these matrices gliadin may be not distributed evenly, therefore, weigh 50 g sample and homogenize: weigh 0.25 g of the homogenized sample and add 2.5 ml of the Cocktail (patented), close the vial and mix well

–**oat samples:** gliadin may not be distributed evenly, furthermore the samples are difficult to homogenize. Therefore, homogenize 200g, then carry out the extraction with at least the fourfold amount of reagents: weigh 1 g of the homogenized sample and add 10 ml of the Cocktail (patented), close the vial and mix well

Please further extract all samples as described in the following:

- incubate for 40 min at 50 °C (122 °F)
- let the sample cool down and then mix it with 7.5 ml 80 % ethanol (see 5.2.) (for oat samples: 30 ml 80 % ethanol)
- close the vial and shake for 1 h up side down or by a rotator at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- centrifuge: 10 min, at least 2500 g, at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) and/or filter the extract (alternatively 2 ml of the extract can be centrifuged with high speed for 10 min in reaction caps by using a microcentrifuge)
- transfer the supernatant in a screw top vial
- dilute the sample 1:12.5 (1+11.5 / 80 µl + 920 µl) with diluted sample diluent (see 10.1.): the final dilution factor is 500
- use **immediately** 100 µl per well in the assay

Remark:

The supernatant obtained after the centrifugation or the filtrate can be stored in a tightly closed vial in the dark at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) up to eight weeks.

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **buffer** is provided as a concentrate (5fold). Only the amount which actually is needed should be diluted 1:5 (1+4) with distilled water (e. g. 3 ml concentrate + 12 ml distilled water, sufficient for the dilution of 10 samples). Make sure that the buffer is not contaminated with gliadin.

The **conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate (11fold). Since the diluted conjugate 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). Take care that the water is not contaminated with gliadin.

The **washing buffer** is provided as a 10fold concentrate. Before use, the buffer has to be diluted 1:10 (1+9) with distilled water (i.e. 100 ml buffer concentrate + 900 ml dist. water). 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 20 - 25 °C (68 -77 °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 6 strips (48 wells) at a time. In the case of more than six 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 standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 100 µl of each standard solution or sample to separate duplicate wells and incubate for 30 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) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl diluted washing buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µl of the diluted conjugate (see 10.1.) to each well and incubate for 30 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 diluted wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen to each well. Mix gently by skaking the plate manually and incubate for 30 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 30 min after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win / RIDA[®]SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays. The calculation should be done by use of a cubic spline function.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit. For quality assurance Gliadin Assay Controls (R7012) should be used.

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 gliadin contamination.

A further dilution and new detection of the samples is recommended for absorbance values ($A_{450\text{ nm}}$) > standard 6.

The gliadin concentration in ng/ml (ppb) is read from the RIDA[®]SOFT Win calibration curve and must be further multiplied by the dilution factor of at least 500. This result is then multiplied by 2 in order to obtain the gluten concentration (gliadin represents 50 % of the proteins present in gluten, Codex Definition). The RIDA[®]SOFT Win (Version 1.93 or newer) indicates the results in gliadin and gluten.

Example:

The absorbance value of a sample corresponds to 10 ng/ml gliadin in the calibration curve. Multiplying by the recommended dilution factor 500 leads to 5000 ng/ml, corresponding to 5 mg/kg (ppm) gliadin, respectively 0.0005 % gliadin. To calculate the gluten content, it is necessary to multiply by factor 2 which results in 10 mg/kg gluten, respectively 0.001 % gluten. This sample is considered to be gluten-free, because the gluten concentration is below 20 mg/kg.

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:

- Each sample material should be analyzed in duplicates
- Use also gluten free and gluten 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
- Confirm results with PCR (e.g. SureFood® Allergen QUANT Gluten, Art.No. S3201)
- In the production of foods such as beer or sourdough, proteins are fragmented. In sandwich ELISAs protein fragments lead to a reduced recovery, such samples should be analyzed with a competitive ELISA test systems like the RIDASCREEN® Gliadin competitive (R7021).
- For details using the ChemWell® or GEMINI automation please contact sales@r-biopharm.de.

Further application notes:

- Sample preparation for processed food with the RIDA® Extraction Solution (colorless) (Art. No. R7098) - **only after validation**
- Sample preparation for raw materials with ethanol.
- Sample preparation for polyphenol containing raw materials (e.g. chocolate, coffee, cacao, buckwheat) with fish gelatine and ethanol

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

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

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