

RIDASCREEN[®] Aflatoxin B1 30/15

Art. No. R1211

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Aflatoxin B1

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
Aflatoxin B1

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® Aflatoxin B1 30/15 (Art. Nr. R1211) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B1 in Getreide und Futtermitteln.

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:	zerkleinern, extrahieren, filtrieren und verdünnen
Zeitbedarf:	Probenvorbereitung (für 10 Proben) ca. 30 min Testdurchführung (Inkubationszeit).....45 min
Nachweisgrenze: (bezogen auf die Standardsubstanz)	Getreide 1 µg/kg (ppb) Soja..... 1,7 µg/kg Futtermittel (repräsentative Proben, z.B. Rinder-/ Schweine-/Geflügel-/Pferde-/Kaninchenfutter) ..4 µg/kg Katzentrockenfutter2 µg/kg
Wiederfindungsrate: (bezogen auf die Standardsubstanz)	ca. 93 % mittlere Wiederfindungsrate bei natürlich kontaminierten Mais-Referenzmaterialien
Spezifität:	Aflatoxin B1 100 % Aflatoxin B2ca. 13 % Aflatoxin G1ca. 29 % Aflatoxin G2ca. 3,2 % Aflatoxin M1ca. 1,5 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten Werten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

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 auf unserer der Webseite unter www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxin B1 in Getreide und Futtermitteln.

2. Allgemeines

Aflatoxine sind sekundäre Stoffwechselprodukte der Schimmelpilze *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *nomius*. Diese Pilzarten kommen in feuchten tropischen Gebieten vor und die Kontamination der pflanzlichen Lebensmittel erfolgt in den Anbauländern. Aflatoxine gehören zu den stärksten natürlich vorkommenden kanzerogenen Substanzen.

Aflatoxin B1, das fast immer gemeinsam mit Aflatoxin B2, G1 und G2 vorkommt, ist das Aflatoxin mit der größten toxischen Bedeutung. Man findet es vor allem in Mais, Erdnüssen, Paranüssen, Baumwollsamensamen und Pistazien.

Aufgrund der Toxizität dieser Mykotoxine gelten EU-weite Höchstmengen für Aflatoxin B1 und für Gesamtaflatoxin in Lebens- und Futtermitteln.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes Aflatoxin (Enzymkonjugat) und anti-Aflatoxin-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes Aflatoxin konkurrieren um die Aflatoxin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden auch die anti-Aflatoxin-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Aflatoxin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogenlösung. Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe von Stopp-Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm. Die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Aflatoxin Konzentration der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können bis zu 90 Bestimmungen durchgeführt werden (plus 6 Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand	Inhalt
Microtiter plate K Mikrotiterplatte K	-	gebrauchsfertig	96 Kavitäten
Standard 1* Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/l 1,3 ml
Standard 2* Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	1 µg/l 1,3 ml
Standard 3* Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	5 µg/l 1,3 ml
Standard 4* Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	10 µg/l 1,3 ml
Standard 5* Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	20 µg/l 1,3 ml
Standard 6* Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	50 µg/l 1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffersalz Tween		Salz zum Auflösen	
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig	6 ml
Antibody Antikörper	schwarz	gebrauchsfertig	6 ml
Substrate/Chromogen Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig	10 ml
Stop solution Stopp-Lösung	gelb	gebrauchsfertig	14 ml

*) Die Konzentrationsangaben berücksichtigen bereits den Verdünnungsfaktor 10, der sich aus der Probenvorbereitung ergibt. So können Aflatoxin B1-Konzentrationen der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte

- Labor- oder Getreidemühle
- Messzylinder (Plastik oder Glas) 100 ml
- Messpipetten
- Filtertrichter und Auffanggefäß (50 ml)
- Filterpapier: Whatman No. 1 oder Vergleichbares
- 50 µl, 100 µl und 1000 µl Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: Schüttler, Zentrifuge

5.2. Reagenzien

- 70 % Methanol: 70 ml Methanol (100 %) mit 30 ml dest. Wasser mischen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Die Standards enthalten Aflatoxin B1. Besondere Vorsicht ist geboten. Hautkontakt mit dem Reagenz vermeiden (Handschuhe tragen).

Die Dekontamination von Glasgeräten und toxischen Lösungen erfolgt am zweckmäßigsten mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (10 % (v/v)) über Nacht (Lösung mit HCl auf pH 7 einstellen).

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.

Aflatoxin B1 ist lichtempfindlich, deshalb die Aflatoxin B1-Standards vor direkter Lichteinwirkung schützen.

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 rötlich gefärbten Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl und lichtgeschützt lagern.

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und den Test bei Raumtemperatur durchführen.

Eine repräsentative Probe (eine unter offiziellen Probenahme-Vorschriften gezogene Probe) vor dem Extrahieren mahlen und gut durchmischen.

- 5 g gemahlene und homogenisierte Probe einwiegen und 25 ml 70 % Methanol hinzufügen *)
- 3 min kräftig schütteln (manuell oder mittels Schüttler)
- den Extrakt durch einen Whatman No. 1 Papierfilter (oder vergleichbaren Filter) filtrieren oder zentrifugieren (10 min / 3500 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C))
- 1 ml des Filtrats bzw. klaren Überstands mit 1 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen
- 50 µl des verdünnten Filtrats pro Kavität im Test einsetzen

*) die Probeneinwaage kann entsprechend vergrößert werden. Dazu muss das Volumen des Methanol/Wasser-Gemisches angepasst werden z. B. 10 g in 50 ml 70 % Methanol

Anmerkung:

Sind höhere Aflatoxin-Konzentrationen zu erwarten, müssen die vorbereiteten Proben weiter verdünnt werden. Bitte beachten Sie, dass die vorbereiteten Proben zum Einsatz im Test immer in einer Methanol/Wasser-Lösung (35/65) vorliegen müssen.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und den Test bei Raumtemperatur durchführen.

Die Aflatoxin B1-Standardlösungen liegen gebrauchsfertig vor. Der Verdünnungsfaktor 10 für die Proben wurde beim Etikettieren der Standardfläschchen bereits berücksichtigt. Deshalb kann die Aflatoxin B1-Konzentration der Proben direkt aus der Standardkurve abgelesen werden.

Nicht verwendete Reagenzien sofort wieder bei 2 - 8 °C lagern.

10.2. Waschpuffer

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt. Zur Herstellung verwenden Sie bitte das beiliegende Waschpuffersalz (siehe 4.). Zur Herstellung des Waschpuffers wird der gesamte Inhalt des Beutels in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10fach Konzentrat). Das 10fach Konzentrat ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen bitte 1 Teil des 10fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.3. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Kavitäten ab. Die beschriebenen Waschsequenzen deshalb bitte immer einhalten. Ein komplettes Eintrocknen der Kavitäten und verzögerte Intervalle zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

Bei allen Inkubationen direkte Sonneneinstrahlung vermeiden und deshalb die Mikrotiterplatten abdecken.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. 50 µl Standard bzw. nach Abschnitt 9. vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jeden Standard und jede Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. 50 µl Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 30 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf sauberen, saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschpuffer (siehe 10.2.) waschen. Diesen Waschvorgang zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min (+/- 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.

7. 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 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.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Wir empfehlen Proben in Doppel- oder Mehrfachbestimmungen zu analysieren. Bitte verwenden Sie zur Auswertung von Doppel- oder Mehrfachbestimmungen die Funktion Cubic Spline der RIDA®SOFT Win.net.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Aflatoxin B1-Konzentration [µg/kg] auftragen. Die Aflatoxin B1-Konzentration in µg/kg kann entsprechend der Extinktion jeder Probe aus der Eichkurve abgelesen werden.

Für weitere Produktinformationen und Applikationen kontaktieren Sie und 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[®] Aflatoxin B1 30/15

Brief information

RIDASCREEN[®] Aflatoxin B1 30/15 (Art. No. R1211) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of aflatoxin B1 in cereals and feed. 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: grinding, extraction, filtration and dilution

Time requirement: sample preparation (for 10 samples)approx. 30 min
test implementation (incubation time)45 min

Detection limit: Cereals 1 µg/kg (ppb)
(corresponding to the Soy..... 1,7 µg/kg
standard substance) Feed (representative samples, e.g. cattle/pig/poultry/
horse/rabbit feed)4 µg/kg
Dry cat food2 µg/kg

Recovery rate: approx. 93% mean recovery rate for naturally
(corresponding to the contaminated corn reference materials
standard substance)

Specificity: Aflatoxin B1 100 %
Aflatoxin B2 approx. 13 %
Aflatoxin G1 approx. 29 %
Aflatoxin G2 approx. 3.2 %
Aflatoxin M1 approx. 1.5 %

The specificity of the RIDASCREEN[®] Aflatoxin B1 30/15 test was determined by analyzing the cross reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the limit of detection and the recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

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 from the website www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis.

1. Intended use

RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of aflatoxin B1 in cereals and feed.

2. General

Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species *Aspergillus flavus*, *parasiticus* and *nomius*. These fungi occur in humid tropical areas and the contamination of vegetable food takes place in the cultivable countries. Aflatoxins belong to the strongest natural occurring carcinogenic substances.

Aflatoxin B1 appears nearly in all cases together with Aflatoxin B2, G1 and G2 and it is the analyte with the highest toxic significance. It is commonly found in corn, peanuts, brazil nuts, cotton seed and pistachios.

Due to the toxicity of these mycotoxins maximum levels for aflatoxin B1 and total aflatoxins for food and feed apply in EU countries.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin antibodies.

Aflatoxin standards or sample solutions, aflatoxin enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free aflatoxin and aflatoxin enzyme conjugate compete for the aflatoxin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-aflatoxin antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, 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 performed photometrically at 450 nm. The absorbance is inversely proportional to the aflatoxin concentration in 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 K	-	Ready to use		96 wells
Standard 1*	White	Ready to use	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2*	White	Ready to use	1 µg/l	1.3 ml
Standard 3*	White	Ready to use	5 µg/l	1.3 ml
Standard 4*	White	Ready to use	10 µg/l	1.3 ml
Standard 5*	White	Ready to use	20 µg/l	1.3 ml
Standard 6*	White	Ready to use	50 µg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Dissolve the salt		
Conjugate	Red	Ready to use		6 ml
Antibody	Black	Ready to use		6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		10 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		14 ml

*) The dilution factor 10 resulting from the sample preparation has already been considered. Therefore, the aflatoxin B1 concentrations of samples can be read directly from the standard curve.

5. Reagents required but not provided

5.1. Equipment

- grinder (mill)
- graduated cylinder (plastic or glass) 100 ml
- graduated pipettes
- filter funnel and 50 ml flask
- filter paper: Whatman No. 1 or equivalent
- 50 µl, 100 µl and 1000 µl micropipettes
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- optional: shaker, centrifuge

5.2. Reagents

- 70 % methanol solution: prepare 70 % methanol solution by mixing 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled or deionized water
- distilled or deionized water

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.

The standard solutions contain aflatoxin B1, particular care should be taken. Avoid contact of the reagent with the skin (use gloves).

Decontamination of glassware and aflatoxin B1 solutions is best carried out using a sodium hypochlorite (bleach) solution (10 %; v/v) overnight (adjust solution with HCl to pH 7).

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).

Aflatoxin B1 is light-sensitive. Therefore, protect the aflatoxin B1 standards from exposure to direct light.

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 red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for the zero standard

9. Preparation of samples

The samples should be stored in a cool place, protected from light.

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

A representative sample (according to accepted sampling techniques) should be ground and thoroughly mixed prior to proceeding with the extraction procedure.

- weigh 5 g of ground and homogenized sample into a suitable container and add 25 ml of 70 % methanol *)
 - shake vigorously for three minutes (manually or with shaker)
 - filter the extract through Whatman No. 1 filter (or equivalent) or centrifuge (10 min / 3500 g / room temperature)
 - dilute 1 ml of the obtained filtrate or clear supernatant with 1 ml of distilled or deionized water
 - use 50 µl of the diluted filtrate per well in the test
- *) sample size may be increased if required, but the volume of methanol/water must be adapted accordingly, e.g.: 10 g in 50 ml of 70 % methanol

Remark:

If high aflatoxin concentrations are expected prepared samples need to be further diluted. Please note that the prepared samples have to be in methanol/water (35/65) solution when analyzed in the assay.

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The aflatoxin B1 standards are provided ready to use. The dilution factor 10 for the sample has been considered when labeling. Therefore, the aflatoxin B1 concentration of samples can be read directly from the standard curve.

Return all reagents to 2 - 8 °C (35 - 46 °F) immediately after use.

10.2. Wash buffer

As **wash buffer** a PBS tween buffer is needed. Please use the wash buffer salt contained in the kit (see 4.). Dissolve the entire buffer salt in one liter of distilled

water. The ready to use wash buffer expires after approx. 4 - 6 weeks at 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

Alternative: Dissolve the contents of the envelope in only 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, stored at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Use 1 part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer.

10.3. Test procedure

Accurate washing is very important. Reproducibility in any enzyme immunoassay is largely dependent upon the consistency with which the microwells are washed. Carefully follow the recommended washing procedure as outlined in the test procedure. Do not allow microwells to dry up totally and avoid prolonged intervals between the working steps.

Avoid direct sunlight during all incubation steps and incubate plates in the dark.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Pipet 50 µl of standard or prepared sample into separate wells. Use a new pipette tip for each standard or sample.
3. Add 50 µl of conjugate to each well.
4. Add 50 µl of antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder vigorously upside down against absorbent paper (three times in a row) to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all the wells with 250 µl wash buffer (see 10.2.). Empty the wells again. Repeat two more times.
6. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min (+/- 1) at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
7. Add 100 µl of stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm. Read within 15 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A specific software, the RIDA[®]SOFT Win.net (Art. Nr. R9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

For sample analysis we recommend to perform double or multiple determinations. Please use the RIDA®SOFT Win.net cubic spline function for test evaluation.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the aflatoxin B1 concentration [$\mu\text{g}/\text{kg}$]. The aflatoxin B1 concentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ corresponding to the absorbance of each sample can be read from the calibration curve.

For further information and applications please contact your local distributor of R-Biopharm AG (sales@r-biopharm.de).

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