

RIDASCREEN[®] Tetracyclin

Art. No. R3505

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung
von Tetracyclin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination
of tetracycline

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® Tetracyclin (Art. Nr.: R3505) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Milch, Milchpulver, Käse, Butter, Milchprodukten (Quark, Joghurt (Natur/mit Früchten), Kefir, Sahne, Saure Sahne), Honig, Fleisch, Wurst, Fisch, Shrimps und Vollei.

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: Milch, Honig: Verdünnung
 Milchpulver: Rekonstituierung, Verdünnung
 Käse: Homogenisierung, Extraktion
 Butter: Schmelzen, Extraktion, Entfettung, Verdünnung
 Milchprodukte: Inkubation, Zentrifugation, Verdünnung
 Fleisch, Wurst, Fisch, Shrimps, Vollei:
 Homogenisierung, Extraktion

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)

Milch.....	ca. 30 min
Milchpulver	ca. 45 min
Käse.....	ca. 90 min
Butter	ca. 60 min
Milchprodukte.....	ca. 40 min
Honig.....	ca. 30 min
Fleisch.....	ca. 45 min
Wurst.....	ca. 40 min
Fisch, Shrimps	ca. 30 min
Vollei	ca. 50 min
Testdurchführung (Inkubationszeit)	1 h 30 min

Nachweisgrenze: Milch ca. 0,9 µg/l
(bezogen auf die Milchpulver ca. 5 µg/kg
Standardsubstanz) Käse..... ca. 2,3 µg/kg
 Butter ca. 2,6 µg/kg
 Milchprodukte..... ca. 1 µg/kg
 Honig..... ca. 3,7 µg/kg
 Fleisch..... ca. 1,5 µg/kg
 Wurst..... ca. 4,6 µg/kg
 Fisch ca. 1,5 µg/kg
 Shrimps..... ca. 1,2 µg/kg
 Vollei ca. 2,8 µg/kg

Wiederfindungsrate:	Milch.....	ca. 111 %
(bezogen auf die	Milchpulver	ca. 102 %
Standardsubstanz)	Käse	ca. 107 %
	Butter	ca. 87 %
	Milchprodukte.....	ca. 94 - 114 %
	Honig.....	ca. 97 %
	Fleisch.....	ca. 99 %
	Wurst.....	ca. 97 %
	Fisch.	ca. 113 %
	Shrimps.....	ca. 97 %
	Vollei	ca. 76 %

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

Spezifität:	Tetracyclin (Standardsubstanz).....	100 %
	Chlortetracyclin	ca. 70 %
	Rolitetracyclin.....	ca. 34 %
	Demeclocyclin	ca. 26 %
	Oxytetracyclin.....	ca. 13 %
	Minocyclin	ca. 3 %
	Doxycyclin	ca. 2 %

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® Tetracyclin Dotierlösung (R3599)

1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Tetracyclin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Tetracyclinen in Milch, Milchpulver, Käse, Butter, Milchprodukten (Quark, Joghurt (Natur/mit Früchten), Kefir, Sahne, Saure Sahne), Honig, Fleisch, Wurst, Fisch, Shrimps und Vollei.

2. Allgemeines

Aureomycin (Chlortetracyclin) wurde 1948 von Duggan als Stoffwechselprodukt der Aktinomycespezies *Streptomyces aureofaciens* isoliert. Dies war das erste Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline. In Deutschland sind Tetracyclin, Chlortetracyclin und Oxytetracyclin in der Veterinärmedizin zugelassen. Deshalb können Gesundheitsgefährdungen für den Verbraucher entstehen.

Nach EU-Recht, Verordnung Nr. 37/2010 sind für Tetracyclin (die Summe von Muttersubstanz und ihrem 4-Epimer) in allen zur Lebensmittelerzeugung genutzten Arten folgende Rückstandshöchstmengen festgelegt: 100 µg/kg im Muskel und in Milch.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit einem Tetracyclin-Protein-Konjugat beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung sowie anti-Tetracyclin-Antikörper. Freies und immobilisiertes Tetracyclin konkurrieren um die Tetracyclin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nach einem Waschschrift werden enzymmarkierte Sekundärantikörper hinzu gegeben, die an die gebundenen anti-Tetracyclin-Antikörper binden. Nicht gebundene, enzymmarkierte Antikörper werden anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat 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 der Lösung ist umgekehrt proportional zur Tetracyclin-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

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

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
Microtiter plate Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
Sample buffer 1 Probenpuffer 1	weiß	gebrauchsfertig		60 ml
Sample buffer 2 Probenpuffer 2	braun	gebrauchsfertig		60 ml
Standard 1 Standard 1	weiß	Konzentrat	0 µg/l	1,3 ml
Standard 2 Standard 2	weiß	Konzentrat	0,5 µg/l	1,3 ml
Standard 3 Standard 3	weiß	Konzentrat	1,5 µg/l	1,3 ml
Standard 4 Standard 4	weiß	Konzentrat	3 µg/l	1,3 ml
Standard 5 Standard 5	weiß	Konzentrat	6 µg/l	1,3 ml
Standard 6 Standard 6	weiß	Konzentrat	18 µg/l	1,3 ml
Wash buffer salt Tween Waschpuffer (Salz) Tween		Salz zum Auflösen		
Conjugate Konjugat	rot	gebrauchsfertig		10 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

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Zentrifuge
- Vortex
- Schüttler
- Wasserbad (für Milchproduktproben)
- Ultraschallbad (optional für Milchpulver- und Honigproben)
- Mixer (Stomacher, Ultra turrax; für Fleisch-, Fisch-, Shrimp- und Wurstproben)
- Pasteurpipetten
- Messpipetten
- variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten

5.2. Reagenzien:

Für Honig-, Fleisch-, Wurst-, Fisch- und Shrimpproben:

–20 mM PBS-Puffer: 0,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl, pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen, ad 1000 ml dest. Wasser

Für Milchpulverproben:

–destilliertes Wasser

Für Käseproben:

–Methanol 10 % (v/v)

Für Fleisch- und Butterproben:

–n-Hexan

Für Volleipproben:

–50 mM Bernsteinsäure-Puffer: 5,9 g Bernsteinsäure in 500 ml dest. Wasser lösen, mit 1 N NaOH auf pH 4,0 einstellen und mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen

6. Vorsichtsmaßnahmen

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

Dieses 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 0,6 ($E_{450\text{ nm}} < 0,6$) für Standard 1

9. Probenvorbereitung

Proben kühl lagern.

9.1. Milch

Milch mit Fettgehalt $> 1,5\%$

- fetthaltige Milch zum Entfetten zentrifugieren: 10 min / 3.000 g / 10 °C (ist keine Kühlzentrifuge vorhanden, sollte die Milchprobe vor der Zentrifugation auf 10 °C abgekühlt werden)
- anschließend die obere Fettschicht vollständig entfernen (z.B. Absaugen mit einer Pasteurpipette) und die entfettete Milch in einem neuen Gefäß 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer 2)
- pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

Milch mit Fettgehalt $\leq 1,5\%$

- Magermilchproben 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer 2)
- pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

9.2. Milchpulver

- 10 g Milchpulver abwiegen und destilliertes Wasser (vortemperiert auf 60 °C) bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml hinzufügen
- 10 min schütteln / rotieren, ggf. länger bis sich das Milchpulver vollständig gelöst hat
optional für schwer lösliche Milchpulver: 3 min in einem Ultraschallbad inkubieren
- zentrifugieren: 10 min / 3.500 g / 10 °C
- anschließend die obere Fettschicht vollständig entfernen (z.B. absaugen mit einer Pasteurpipette) und die entfettete Milch in einem neuen Gefäß 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen (z. B. 50 µl Milch + 450 µl Probenpuffer 2)
- pro Kavität 50 µl im Test einsetzen

9.3. Käse

- zu 5 g Käse 20 ml Methanol 10 % (v/v) hinzugeben
- Probe homogenisieren (Mixer, Stomacher oder Ultraturrax)
- die homogenisierte Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- 10 min über Kopf schütteln
- zentrifugieren: 15 min / 3.000 g / 4 °C
- 1 ml der mittleren wässrigen Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- zentrifugieren: 5 min / 20.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Überstand 1:5 (1+4) mit Probenpuffer 2 verdünnen
(z.B. 100 µl Überstand + 400 µl Probenpuffer 2)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.4. Butter

- 1 g Butter in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen
- die Butter in einem Wasserbad bei ca. 40 °C schmelzen
- 1 ml n-Hexan hinzufügen und durch vortexen (1 min) gut mischen
- 1 ml Methanol 20 % (v/v) hinzugeben
- 10 s gründlich vortexen
- 10 min rotieren
- zentrifugieren: 10 min / 2.000 g / 4 °C
- die obere Hexanphase vorsichtig mittels Pasteurpipette abnehmen und verwerfen
- 1 ml n-Hexan hinzufügen und 1 min gründlich vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 2.000 g / 4 °C
- 1 ml der unteren wässrigen Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und auf Eis stellen
- zentrifugieren: 10 min / 20.000 g / (20 - 25 °C)
- ein Aliquot der unteren wässrigen Phase 1:17 (1+16) mit Probenpuffer 1 verdünnen (z.B. 50 µl Probe + 800 µl Probenpuffer 1)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.5. Milchprodukte (Quark, Joghurt (Natur/mit Früchten), Kefir, Sahne, Saure Sahne

- 5 g der Probe in ein Zentrifugenröhrchen einwiegen
- 15 min bei 50 °C inkubieren (z.B. in einem Wasserbad)
- vortexen bis die Probe vollständig homogenisiert ist
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / 10 °C
- den Überstand 1:10 (1+9) mit Probenpuffer 2 verdünnen
(z. B. 50 µl Überstand + 450 µl Probenpuffer 2)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.6. Honig

- 1 g Honig in ein 80 ml Glasgefäß mit Schraubverschluss einwiegen
- 1:50 (1+49) mit 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4 (siehe 5.2.) verdünnen
(z.B. 1 g Honig + 50 ml 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4)
optional für schwer lösliche Honigproben: 5 min in einem Ultraschallbad inkubieren
- 2 min intensiv vortexen
- vor dem Einsatz der Proben die Probengefäße kurz „über Kopf“ schwenken
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.7. Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel)

- Probe homogenisieren (Fleischwolf, Mixer, Stomacher oder Ultraturrax)
- 1 g der homogenisierten Probe in ein Zentrifugenröhrchen überführen und 9 ml 20 mM PBS-Puffer pH 7,4 (siehe 5.2.) hinzugeben
- Probe und Puffer mischen (Vortex)
- 10 min extrahieren (Schüttler)
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 1 ml Überstand in ein frisches Gefäß überführen
- 2 ml Hexan zugeben
- 10 s vortexen
- zentrifugieren: 10 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der unteren wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.8. Wurst (Salami, Schinken, Mortadella)

- 3 g Probe mit 30 ml 20 mM PBS-Puffer, pH 7,4 homogenisieren (Stomacher, Ultraturrax)
- Probe in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / 10 °C
- den Überstand 1:2 (1+1) mit Probenpuffer 1 verdünnen
(z.B. 500 µl Überstand + 500 µl Probenpuffer 1)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

9.9. Fisch und Shrimps

- Probe homogenisieren (Fleischwolf, Mixer, Stomacher oder Ultraturrax)
- 1 g homogenisierte Probe in ein Zentrifugenröhrchen überführen und 9 ml 20 mM PBS-Puffer pH 7,4 (siehe 5.2.) hinzugeben
- Probe und Puffer mischen (Vortex)
- zur Extraktion 10 min schütteln / rotieren
- zentrifugieren: 10 min / 4.000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- 50 µl der oberen wässrigen Phase pro Kavität im Test einsetzen

9.10. Vollei

- Eiweiß und Eigelb von einem Ei vollständig homogenisieren
- 4 g der Mischung in ein 50 ml Propylengefäß überführen und 20 ml 50 mM Bernsteinsäure-Puffer hinzugeben
- schütteln oder rotieren: 15 min / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- zentrifugieren: 15 min / 4000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- den Überstand 1:10 (1+9) mit 20 mM PBS-Puffer verdünnen
(z.B. 100 µl Überstand + 900 µl 20 mM PBS-Puffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Die **Standards** liegen als Konzentrat vor. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Tetracyclin-Standards je 50 µl Konzentrat mit 450 µl **Probenpuffer** verdünnen und gut mischen. Es sollten keine Plastik-, sondern Glasgefäße verwendet werden.

Für Butter-, Honig-, Fleisch-, Wurst-, Fisch-, Shrimp- und Volleiprobe n bitte **Probenpuffer 1** zur Verdünnung der Standards verwenden.

Für Milch- und Milchpulver, Käse-, und Milchproduktproben bitte **Probenpuffer 2** zur Verdünnung der Standards verwenden.

Standard 1: 50 µl Standardkonzentrat	(0 µg/l) + 450 µl Puffer	0 µg/l
Standard 2: 50 µl Standardkonzentrat	(0,5 µg/l) + 450 µl Puffer	0,05 µg/l
Standard 3: 50 µl Standardkonzentrat	(1,5 µg/l) + 450 µl Puffer	0,15 µg/l
Standard 4: 50 µl Standardkonzentrat	(3 µg/l) + 450 µl Puffer	0,3 µg/l
Standard 5: 50 µl Standardkonzentrat	(6 µg/l) + 450 µl Puffer	0,6 µg/l
Standard 6: 50 µl Standardkonzentrat	(18 µg/l) + 450 µl Puffer	1,8 µg/l

Die Standards müssen für jede Versuchsreihe frisch hergestellt werden

Als **Waschpuffer** wird ein PBS-Tween-Puffer benötigt, benutzen Sie dazu bitte das beiliegende Waschpuffer-Salz (siehe 4.). Zur Herstellung des Puffers den gesamten Inhalt des Beutels in 1 l destilliertem Wasser lösen. Der gelöste Waschpuffer ist ca. 4 - 6 Wochen bei 2 - 8 °C haltbar.

Alternativ: Inhalt des Beutels in 100 ml dest. Wasser lösen (10-fach Konzentrat). Die Lösung ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen, 1 Teil des 10-fach Konzentrats mit 9 Teilen dest. Wasser mischen.

10.2. Testdurchführung

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

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 50 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl anti-Tetracyclin-Antikörper in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
4. 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
5. Je 100 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
6. 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 Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
7. Je 100 µl Substrat/Chromogen in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
8. 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.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 Tetracyclin-Konzentration [µg/l] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche Tetracyclin-Konzentration in µg/l bzw. µg/kg zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gelten für folgende Verdünnungsfaktoren:

Milch, Milchprodukte, Fleisch,	
Shrimp, Fisch	10
Milchpulver	100
Käse	25
Butter, Wurst	20
Honig	50
Vollei	60

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® Tetracyclin

Brief information

RIDASCREEN® Tetracyclin (Art. No.: R3505) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of tetracyclins in milk, milk powder, cheese, butter, dairy products (curd, yoghurt (plain/with fruits), kefir, cream, sour cream) honey, meat, sausage, fish, shrimp and whole egg.

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:	milk, honey: dilution milk powder: reconstitution, dilution cheese: homogenization, extraction butter: melting, extraction, degreasing, dilution dairy products: incubation, centrifugation, dilution honey: dissolve meat, sausage, fish, shrimp, whole egg: homogenization, extraction
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) milk..... approx. 30 min milk powder approx. 45 min cheese approx. 90 min butter..... approx. 60 min dairy products..... approx. 40 min honey approx. 30 min meat..... approx. 45 min sausage approx. 40 min fish, shrimp..... approx. 30 min whole egg..... approx. 50 min test implementation (incubation time) 1 h 30 min
Detection limit: (corresponding to the standard substance)	milk..... approx. 0.9 µg/l milk powder approx. 5 µg/kg cheese approx. 2.3 µg/kg butter..... approx. 2.6 µg/kg dairy products..... approx. 1 µg/kg honey approx. 3.7 µg/kg meat..... approx. 1.5 µg/kg sausage approx. 4.6 µg/kg fish approx. 1.5 µg/kg shrimp approx. 1.2 µg/kg whole egg..... approx. 2.8 µg/kg

Recovery rate:	milk.....	approx. 111 %
(corresponding to the	milk powder	approx. 102 %
standard substance)	cheese	approx. 107 %
	butter	approx. 87 %
	dairy products.....	approx. 94 - 114 %
	honey	approx. 97 %
	meat.....	approx. 99 %
	sausage	approx. 97 %
	fish	approx. 113 %
	shrimp	approx. 97 %
	whole egg.....	approx. 76 %

The specificity of the RIDASCREEN® Tetracyclin-test was determined by analyzing the crossreactivities 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.

Specificity:	Tetracycline (standard substance).....	100 %
	Chlortetracycline	approx. 70 %
	Rolitetetracycline	approx. 34 %
	Demeclocycline	approx. 26 %
	Oxytetracycline.....	approx. 13 %
	Minocycline	approx. 3 %
	Doxycycline	approx. 2 %

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® Tetracyclin Spiking Solution (R3599)

1. Intended use

RIDASCREEN® Tetracyclin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of tetracyclins in milk, milk powder, cheese, butter, dairy products (curd, yoghurt (plain/with fruits), kefir, cream, sour cream) honey, meat, sausage, fish, shrimp and whole egg.

2. General

1948 aureomycin (chlortetracycline) was isolated by Duggan as a metabolite of the actinomyces species *streptomyces aureofaciens*. This was the first antibiotic substance of the group of tetracyclines. In Germany tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline are authorized for veterinary use. Therefore health risks for the consumer can occur.

In all animal species used for food production, tetracycline residues (sum of parent substance and 4-epimer) are limited in the EU law, commission regulation (EU) No 37/2010 with the following limits: 100 µg/kg in muscle and in milk.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with tetracycline-protein-conjugate. Tetracycline standards or sample solutions and anti-tetracycline antibodies are added. Free tetracycline and immobilized tetracycline compete for the tetracycline antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound antibody is then removed in a washing step and enzyme labeled secondary antibody, which is directed against the anti-tetracycline antibody, is added. After removing unbound enzyme labeled antibodies by a washing step, substrate/chromogen is added to the wells and incubated. Bound conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the tetracycline concentration in the sample.

4. Reagents provided

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

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Sample buffer 1	White	Ready to use		60 ml
Sample buffer 2	Brown	Ready to use		60 ml
Standard 1	White	Concentrate	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2	White	Concentrate	0.5 µg/l	1.3 ml
Standard 3	White	Concentrate	1.5 µg/l	1.3 ml
Standard 4	White	Concentrate	3 µg/l	1.3 ml
Standard 5	White	Concentrate	6 µg/l	1.3 ml
Standard 6	White	Concentrate	18 µg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Salt for dissolving		
Conjugate	Red	Ready to use		10 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

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- centrifuge
- vortex
- shaker
- waterbath (for dairy product samples)
- ultrasonic bath (optional for milk powder and honey samples)
- mixer (Stomacher, ultra turrax; for meat, fish, shrimp and sausage samples)
- pasteur pipettes
- graduated pipettes
- variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes

5.2. Reagents:

for honey, meat, sausage, fish and shrimp samples:

–20 mM PBS buffer: 0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl, adjust pH to 7.4 with 1 M NaOH, fill up to 1000 ml with distilled water

for milk powder samples:

–distilled water

for cheese samples:

–methanol 10 % (v/v)

for meat and butter samples:

–n-hexane

for whole egg samples:

–50 mM succinic acid buffer: dissolve 5.9 g of succinic acid in 500 ml of distilled water, adjust pH to 4.0 with 1 N NaOH, fill up to 1000 ml with distilled 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.

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 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 0.6 absorbance units ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) for standard 1

9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place.

9.1. Milk

Milk with fat content > 1.5 %:

- centrifuge fatty milk samples: 10 min / 3,000 g / 10 °C (50 °F)
(if a refrigerated centrifuge is not available, chill sample to 10 °C (50 °F) prior to centrifugation)
- remove the upper cream layer completely (e.g. with a pasteur pipette) and dilute the resulting skimmed milk 1:10 (1+9) with sample buffer 2 in a new vial (e. g. 50 µl milk + 450 µl sample buffer 2)
- use 50 µl per well in the assay

Milk with fat content ≤ 1.5 %:

- dilute skimmed milk samples 1:10 (1+9) with sample buffer 2
(e. g. 50 µl milk + 450 µl sample buffer 2)
- use 50 µl per well in the assay

9.2. Milk powder

- weigh 10 g of milkpowder and add pre-warmed distilled water (60 °C / 140 °F) to a final volume of 100 ml
- shake / rotate for 10 min or longer until milk powder is dissolved completely
optional for milk powders which do not dissolve easily: incubate for 3 min in an ultrasonic bath
- centrifuge: 10 min / 3,500 g / 10 °C (50 °F)
- remove the upper cream layer completely (e.g. with a pasteur pipette) and dilute the resulting skimmed milk 1:10 (1+9) with sample buffer 2 in a new vial (e. g. 50 µl milk + 450 µl sample buffer 2)
- use 50 µl per well in the assay

9.3. Cheese

- add 20 ml of methanol 10 % (v/v) to 5 g of cheese
- homogenize the sample (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- transfer the homogenized sample into a 50 ml centrifugal vial
- shake 10 min upside-down
- centrifuge: 15 min / 3,000 g / 4 °C (39.2 °F)
- transfer 1 ml of the aqueous (middle) phase into a 1.5 ml vial
- centrifuge 5 min / 20,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute supernatant 1:5 (1+4) in sample buffer 2
(e.g. 100 µl supernatant + 400 µl sample buffer 2)
- use 50 µl per well in the assay

9.4. Butter

- weigh 1 g butter into a 10 ml centrifugal vial
- melt the butter in a water bath at approx. 40 °C (104 °F)
- add 1 ml n-hexane and mix vigorously for 1 min on a vortex
- add 1 ml methanol 20 % (v/v)
- mix vigorously for 10 s on a vortex
- rotate the vial for 10 min
- centrifuge: 10 min / 2,000 g / 4 °C (39.2 °F)
- remove the upper hexane layer carefully with a pasteur pipette
- add 1 ml of n-hexane and mix vigorously for 1 min on a vortex
- centrifuge: 10 min / 2,000 g / 4 °C (39.2 °F)
- transfer 1 ml of the lower aqueous layer into a 1.5 ml vial and put the vial on ice
- centrifuge: 10 min / 20,000 g / (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute an aliquot of the lower aqueous phase 1:17 (1+16) with sample buffer 1
(e.g.: 50 µl sample + 800 µl sample buffer 1)
- use 50 µl per well in the assay

9.5. Dairy products (curd, yoghurt (plain/with fruits) kefir, cream, sour cream)

- transfer 5 g of the sample into a centrifugal vial
- incubate the sample for 15 min at 50 °C (122 °F), e.g. in a waterbath
- vortex until the sample is homogenized completely
- centrifuge: 10 min / 4000 g / 10 °C (50 °F)
- dilute the supernatant 1:10 (1+9) with sample buffer 2
(e. g. 50 µl supernatant + 450 µl sample buffer 2)
- use 50 µl per well in the assay

9.6. Honey

- weigh 1 g of honey in a screw top glass vial (80 ml)
- dilute 1:50 (1+49) with 20 mM PBS buffer, pH 7.4 (see 5.2.)
(e.g. 1 g honey + 50 ml 20 mM PBS buffer, pH 7.4)
optional for honey samples which do not dissolve easily: incubate 5 min in an ultrasonic bath
- mix intensively for 2 min on a vortex
- before use in the test shake the vials upside down briefly
- use 50 µl per well in the assay

9.7. Meat (beef, pork, poultry)

- homogenize the sample (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- transfer 1 g of the homogenized sample into a centrifugal vial and add 9 ml 20 mM PBS buffer pH 7.4 (see 5.2.)
- vortex sample and buffer
- shake 10 min for extraction
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- transfer 1 ml of supernatant into a new vial
- add 2 ml of hexane
- vortex for 10 s
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 50 µl of the lower aqueous phase per well in the assay

9.8. Sausage (salami, ham, mortadella)

- homogenize 3 g of the sample and 30 ml 20 mM PBS buffer, pH 7.4 (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- transfer the sample into a centrifugal vial
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / 10 °C (50 °F)
- dilute the supernatant 1:2 (1+1) with sample buffer 1
(e.g. 500 µl supernatant + 500 µl sample buffer 1)
- use 50 µl per well in the assay

9.9. Fish and shrimp

- homogenize the sample (use stomacher, mixer or ultra turrax)
- transfer 1 g of the homogenized sample into a centrifugal screw cap vial and add 9 ml 20 mM PBS buffer pH 7.4 (see 5.2.)
- vortex sample and buffer
- shake/rotate the sample for 10 min for extraction
- centrifuge: 10 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- use 50 µl of the upper aqueous phase per well in the assay

9.10. Whole egg

- homogenize egg yolk and egg white of one egg thoroughly
- transfer 4 g of the mixed egg into a 50 ml polypropylene vial and add 20 ml of 50 mM succinic acid buffer
- mix 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) by shaking / rotating
- centrifuge: 15 min / 4,000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- dilute supernatant 1:10 (1+9) with 20 mM PBS buffer, pH 7.4
(e.g. 100 µl of supernatant + 900 µl 20 mM PBS buffer, H 7.4)
- use 50 µl per well in the assay

10. Test implementation

10.1. Test preparation

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

The **standards** are provided as concentrates. In order to produce tetracycline standards ready to use, dilute 50 µl standard concentrate with 450 µl **Sample buffer** in each case and mix thoroughly. Use glass vials.

For butter, honey, meat, sausage, fish, shrimp and whole egg samples use **sample buffer 1** for dilution of concentrates.

For milk, milk powder, cheese and dairy products, use **sample buffer 2** for dilution of concentrates.

Standard 1: 50 µl standard concentrate	(0 µg/l) + 450 µl buffer	0 (µg/l)
Standard 2: 50 µl standard concentrate	(0.5 µg/l) + 450 µl buffer	0.05 (µg/l)
Standard 3: 50 µl standard concentrate	(1.5 µg/l) + 450 µl buffer	0.15 (µg/l)
Standard 4: 50 µl standard concentrate	(3 µg/l) + 450 µl buffer	0.3 (µg/l)
Standard 5: 50 µl standard concentrate	(6 µg/l) + 450 µl buffer	0.6 (µg/l)
Standard 6: 50 µl standard concentrate	(18 µg/l) + 450 µl buffer	1.8 (µg/l)

The standards must be prepared freshly for each test series.

A PBS-Tween buffer is needed as **wash buffer**, please use the washing buffer salt (pouch) contained in the kit (see 4.). Dissolve the total content of the pouch 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).

Alternatively: Dissolve the contents of the pouch in 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 one part of this concentrate and dissolve with 9 parts of distilled water to obtain the ready to use wash buffer.

10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

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 50 µl of each standard or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of anti-tetracycline antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. 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.
5. Add 100 µl of conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
6. 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.
7. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 15 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
8. 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 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win / RIDA[®]SOFT Win.net (Art. No. Z9996), is available for evaluation of the RIDASCREEN[®] enzyme immunoassays.

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

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

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 tetracycline concentration [$\mu\text{g/l}$].

In order to obtain the tetracycline concentration in $\mu\text{g/l}$ or $\mu\text{g/kg}$ actually contained in a sample, the concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factors are as follows:

milk, dairy products, meat, shrimp, fish	10
milk powder	100
cheese	25
butter, sausage	20
honey	50
whole egg	60

For further information or applications please contact your local distributor or info@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