

RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total

Art. No. R4701

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Aflatoxin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of
Aflatoxin

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 Total (Art. Nr. R4701) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxinen in Getreide und Futtermitteln.

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

Der Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschließlich Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: zerkleinern, extrahieren, filtrieren/zentrifugieren und verdünnen

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)..... ca. 30 min
Testdurchführung (Inkubationszeit).....45 min

Nachweisgrenze: ca. 1,75 ppb
(bezogen auf die Standardsubstanz)

Wiederfindungsrate: ca. 85 %
(bezogen auf die Standardsubstanz) mittlerer Variationskoeffizient: 15 %

Spezifität: Aflatoxin B1..... 100 %
Aflatoxin B2.....ca. 48 %
Aflatoxin G1ca. 75 %
Aflatoxin G2ca. 18 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Aflatoxin Total 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 Total ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aflatoxinen 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, Baumwollsaamen 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 Mikrotiterplatten sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-Aflatoxin-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probenlösungen, 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 des 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 in 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 M Mikrotiterplatte M | - | gebrauchsfertig | | 96 Kavitäten |
| Standard 1* Standard 1 | weiß | gebrauchsfertig | 0 µg/l | 1,3 ml |
| Standard 2* Standard 2 | weiß | gebrauchsfertig | 0,05 µg/l | 1,3 ml |
| Standard 3* Standard 3 | weiß | gebrauchsfertig | 0,15 µg/l | 1,3 ml |
| Standard 4* Standard 4 | weiß | gebrauchsfertig | 0,45 µg/l | 1,3 ml |
| Standard 5* Standard 5 | weiß | gebrauchsfertig | 1,35 µg/l | 1,3 ml |
| Standard 6* Standard 6 | weiß | gebrauchsfertig | 4,05 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 |

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
- variable 20 µl - 200 µl- und 200 - 1000 µl-Mikropipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Optional: Schüttler

5.2. Reagenzien

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

Aflatoxine sind lichtempfindlich, deshalb vor direkter Lichteinwirkung schützen.

Die rötlich gefärbte Substrat-/Chromogenlösung ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

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

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

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung der 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 und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und die Probenvorbereitung bei Raumtemperatur durchführen.

Eine repräsentative Probe mit einer Labormühle mahlen und gut durchmischen.

- 2 g gemahlene und homogenisierte Probe einwiegen und 10 ml 70% Methanol hinzufügen *)
- 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mischen
- den Extrakt über einen Whatman No. 1 Papierfilter (oder vergleichbaren Filter) filtrieren oder zentrifugieren (10 min / 3500 g / Raumtemperatur)
- 100 µl des Filtrats mit 600 µl dest. 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:

Werden Aflatoxingehalte von > 120 ppb erwartet, ist eine weitere Verdünnung notwendig. Hierzu muss dest. Wasser mit 10 % Methanol verwendet werden. (z.B. 9 ml dest. Wasser + 1 ml 100 % Methanol). Bitte beachten Sie, dass die vorbereiteten Proben zum Einsatz im Test immer in dest. Wasser mit 10%igem Methanolanteil vorliegen müssen.

Zur Analyse von Nuss-, Kräuter-, Gewürz- oder Teeblattproben verwenden Sie bitte eine Probenvorbereitung mittels Immunaффinitätssäule. Fordern Sie hierzu Information zum Produkt RIDA[®] Aflatoxin column (R5001 / R5002) an.

Auf Anfrage ist eine Applikation für Rohkaffee in Kombination mit RIDA[®] Aflatoxin column (R5001 / R5002) erhältlich.

Bitte beachten Sie, dass bei den Probenaufarbeitungen mit RIDA[®] Aflatoxin column (R5001 / R5002) die entsprechenden Eluate mit dest. Wasser 1:10 verdünnt werden müssen (siehe Abschnitt 9.1. der RIDA[®] Aflatoxin column (R5001 / R5002) Testkitbeschreibung). Für alle weiteren Verdünnungen ist es unbedingt erforderlich dest. Wasser mit 10 % Methanol zu verwenden.

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

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 den gesamten Inhalt des Beutels in 1 Liter 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 (10fach Konzentrat). Die Lösung (10fach Konzentrat) ist ca. 8 - 12 Wochen bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) haltbar.

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

10.3. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein 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. Je 50 µl Standard bzw. nach Abschnitt 9. vorbereitete Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Für jeden Standard oder Probe neue Pipettenspitzen benutzen.
3. Je 50 µl Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl Antikörper die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig durch leichte manuelle Bewegung der Platte mischen und 30 min 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 saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten jeweils mit 250 µl Waschpuffer (siehe 10.2.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. 100 µl Substrat/Chromogen in jede Kavität pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 15 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Lösung in jede Kavität pipettieren. 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.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-Konzentration [ng/kg] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Aflatoxin-Konzentration in ng/kg zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt folgender Verdünnungsfaktor:

Getreide und Futtermittel35

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 Total

Brief information

RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total (Art. No. R4701) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of aflatoxins 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/centrifugation and dilution

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

Detection limit: cereals and feed: approx. 1.75 ppb
(corresponding to the standard substance)

Recovery rate: approx. 85 %
(corresponding to the standard substance) coefficient of variation: 15 %

Cross reactivity: Aflatoxin B₁ 100 %
Aflatoxin B₂ approx. 48 %
Aflatoxin G₁ approx. 75 %
Aflatoxin G₂ approx. 18 %

The specificity of the RIDASCREEN[®] Aflatoxin Total 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 Total is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of aflatoxins in cereals and feed.

2. General

Aflatoxins are secondary metabolites of the fungi species *Aspergillus flavus*, *parasiticus* und *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 cancerogenic substances.

Aflatoxin B₁ which is mostly found together with the aflatoxins B₂, G₁ and G₂ is the one with the highest toxic importance. It is found above all 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 wells in the microtiter strips are coated with capture antibodies directed against anti-aflatoxin antibodies. Standards or the sample solutions, aflatoxin-enzyme conjugate and anti-aflatoxin antibodies are added. Free and enzyme conjugated aflatoxin 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 solution is added to the wells and incubated. 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 absorption 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 | | Content |
|--|-----------|-------------------|-----------|----------|
| Microtiter plate M | - | Ready to use | | 96 wells |
| Standard 1* | White | Ready to use | 0 µg/l | 1.3 ml |
| Standard 2* | White | Ready to use | 0,05 µg/l | 1.3 ml |
| Standard 3* | White | Ready to use | 0,15 µg/l | 1.3 ml |
| Standard 4* | White | Ready to use | 0,45 µg/l | 1.3 ml |
| Standard 5* | White | Ready to use | 1,35 µg/l | 1.3 ml |
| Standard 6* | White | Ready to use | 4,05 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 |

5. Materials 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
- variable 20 µl - 200 µl- and 200 - 1000 µl micropipettes
- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- optional: shaker, centrifuge

5.2. Reagents

- 70 % methanol solution: mix 70 ml methanol (100 %) with 30 ml distilled water
- 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.

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

Decontamination of the glassware and aflatoxin 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).

Aflatoxins are light-sensitive, therefore, avoid 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 solution 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 and perform the sample preparation at room temperature.

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

- weigh 2 g of the ground and homogenized sample into a suitable container and add 10 ml of 70 % methanol*)
- mix for 10 min at room temperature using a shaker
- filter the extract through a Whatman No. 1 filter (or equivalent) or centrifuge (10 min / 3500 g / room temperature)
- dilute 100 µl of the filtrate with 600 µl distilled 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 the aflatoxin concentration is expected to exceed 120 ppb further dilutions are necessary. For this use distilled water containing 10 % methanol (i.e. 9 ml distilled water + 1 ml methanol (100 %)). Please note that any kind of sample being used in the assay has to be provided in distilled water with 10 % methanol.

For the analysis of nut, herb, spice or tea leave samples please perform a sample preparation using immunoaffinity columns. For this please request the RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) product information.

An application note for green coffee in combination with RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) is available on request. Please contact your local distributor.

Please note, that for the sample preparations with RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002) the respective eluates have to be diluted 1:10 with distilled water (see section 9.1. of the instructions for use of RIDA® Aflatoxin column (R5001 / R5002)) . For all further dilutions the use of distilled water with 10 % methanol is absolutely essential.

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.

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 100 ml of distilled water to obtain a 10fold concentrated wash buffer. This solution expires after approx. 8 - 12 weeks, store 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

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry up 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 microtiter wells into the microwell holder for all standards and samples to be run. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of the standard or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of the conjugate to each well.
4. Add 50 µl of the antibody to each well. Mix gently by shaking the plate manually 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 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 at room temperature (20 - 25 °C; 68 - 77 °F).
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 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A specific software, the RIDA[®]SOFT Win.net (Art. No. Z9996), 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 evaluation of double or multiple determinations.

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 concentration [ng/kg].

In order to obtain the aflatoxin concentration in ng/kg actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is as follows:

cereals and feed 35

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