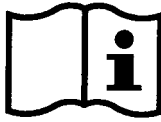


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Mustard ELISA



DEMUSE01



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS/ INHALTSVERZEICHNIS

1. GENERAL INFORMATION.....	3
2. PRINCIPLE OF THE TEST.....	3
3. PRECAUTIONS.....	3
4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS.....	3
5. REAGENTS.....	4
6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)	4
7. SAMPLE PREPARATION.....	4
8. PROCEDURE	5
9. CALCULATION OF RESULTS.....	5
10. TYPICAL STANDARD VALUES	6
11. PERFORMANCE.....	6
1. ALLGEMEINES.....	8
2. TESTPRINZIP.....	8
3. VORSICHTSMAßNAHMEN.....	8
4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN	9
5. REAGENZIEN.....	9
6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN.....	9
7. PROBENVORBEREITUNG	9
8. TESTDURCHFÜHRUNG	10
9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....	10
10. TYPISCHE STANDARDKURVE	11
11. TECHNISCHE DATEN	11
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	12

Sensitivity (Mustard)	1 ppm
Recovery	73-96 %
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

Mustard belongs to the Brassica plants. With about 30-35% the fraction of proteins in mustard seed is very high. Some of these proteins are known for being allergenic, such as Sin a 1 and Bra j 1. These proteins are predominantly heat resistant making them stable to different production processes. In addition to brown mustard (*Brassica juncea*) and black mustard (*Brassica nigra*) primarily yellow mustard (*Sinapsis alba*) is used as an ingredient in many foods and food preparations. For mustard allergic persons hidden mustard allergens in food are a critical problem. Already very low amounts of mustard can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, mustard allergic persons must strictly avoid the consumption of mustard or mustard containing food. Cross-contamination, mostly in consequence of the production process, is often noticed. The sausage production process is a representative example. This explains why in many cases the existence of mustard residues in food cannot be excluded. For this reason sensitive detection systems for mustard residues in foodstuffs are required.

The **Mustard ELISA** represents a highly sensitive detection system for yellow mustard and is particularly capable of the quantification of residues in sausage, dressings, soups, cheese and mixed herbs. Due to high cross-reactivity the test is also suitable for the detection of brown mustard and black mustard.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Mustard** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against mustard proteins is bound on the surface of a microtiter plate. Mustard containing samples or standards are given into the wells of the microtiter plate. After 20 minutes incubation at room temperature, the wells are washed with diluted washing solution to remove unbound material. A peroxidase conjugated second antibody directed against mustard proteins is given into the wells and after 20 minutes of incubation the plate is washed again. A substrate solution is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue colour. The colour development is inhibited by the addition of a stop solution, and the colour turns yellow. The yellow colour is measured photometrically at 450 nm. The concentration of mustard is directly proportional to the colour intensity of the test sample.

3. PRECAUTIONS

Full compliance of the following good laboratory practices (GLP) will determine the reliability of the results:

1. Prior to beginning the assay procedure, bring all reagents to room temperature (20-25°C).
2. All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming.
3. Once the assay has been started, all subsequent steps should be completed without interruption and within the recommended time limits.
4. Replace caps in all the reagents immediately after use. Do not interchange vial stoppers.
5. Use a separate disposable tip for each specimen to prevent cross-contamination.
6. All specimens and standards should be run at the same time, so that all conditions of testing are the same.
7. Do not mix components from different batches.
8. Do not use reagents after expiration date.
9. Check both precision and accuracy of the laboratory equipment used during the procedure (micropipets, ELISA reader etc.).

4. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

1. Do not smoke or eat or drink or pipet by mouth in the laboratory.
2. Wear disposable gloves whenever handling patient specimens.
3. Avoid contact of substrate and stop solution with skin and mucosa (possible irritation, burn or toxicity hazard). In case of contact, rinse the affected zone with plenty of water.
4. Handling and disposal of chemical products must be done according to good laboratory practices (GLP).

5. REAGENTS

The kit contains reagents for 96 determinations. They have to be stored at 2-8°C. Expiry data are printed on the labels of the bottles and the outer package.

1. **SORB MT** Microtiter plate consisting of 12 strips with 8 breakable wells each, coated with anti-mustard antibodies.
2. **CAL 1 – 5** Mustard Standards (0; 2; 6; 20; 60 ppm of mustard): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use.
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-mustard-peroxidase): 15 mL, dyed red, ready-to-use.
4. **SUB TMB** Substrate Solution (TMB): 15 mL, ready-to-use.
5. **STOP SOLN** Stop Solution (0.5 M H₂SO₄): 15 mL, ready-to-use.
6. **SAM DIL 10x** Extraction and sample dilution buffer (Tris): 2 x 120 mL as 10x concentrate, dyed red. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least one week. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
7. **WASH SOLN 10x** Washing Solution (PBS + Tween 20): 60 mL as 10x concentrate. Dilute 1+9 with distilled water. Stored at 4°C the diluted buffer is stable for at least 4 weeks. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up to 37°C for 15 minutes.
8. Plastic bag to store unused microtiter strips.
9. Instruction Manual.

6. ADDITIONAL INSTRUMENTATION AND REAGENTS (NOT PROVIDED)

Instrumentation

- 100 - 1000 µL micropipets
- Volumetric flask
- Analytical balance
- Mortar, mixer
- Water bath
- Centrifuge
- ELISA reader (450 nm)

Reagents

- double distilled water

7. SAMPLE PREPARATION

Due to high risk of cross-contamination all applied instruments like applicator, mortar, glass vials etc. have to be **cleaned thoroughly** before and after each sample. Mustard proteins could adhere to different surfaces. To identify possible cross-contamination caused by previous extractions it is strongly recommended to note the sequence of the extractions.

The following sample preparation should be applied for solid samples:

1. To maximize homogeneity and representativeness of the sample drawing, a minimum of 5 g sample should be pulverized finely in a mortar, impact mill, etc.
2. 1 g of the homogenized mixture is suspended in 20 mL of **pre-diluted** extraction buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes.
3. The samples are centrifuged for 10 minutes at ≥2000 g. If it is not possible to separate the supernatant from the precipitate completely, the suspension should be filtrated.
4. 100 µL of particle-free solution are applied per well. If the results of a sample are out of the measuring range, further dilution with the **pre-diluted** extraction and sample dilution buffer is necessary. The additional dilution has to be considered when calculating the concentration.

The following sample preparation should be applied for liquid samples:

1 mL of liquid sample is diluted in 19 mL of pre-diluted extraction and sample dilution buffer. Afterwards the suspension is incubated for 15 min in a preheated water bath at 60°C. To ensure good homogeneity, the samples should be shaken every two minutes. The process is continued at point 3 of solid sample extraction process.

Attention:

- Do not shake the final extract to prevent from re-suspension.
- If after centrifugation a third layer at the top appears due to a high fatty matrix, only the middle aqueous phase should be applied to the wells.

8. PROCEDURE

The washing solution is supplied as 10x concentrate and has to be **diluted** 1+9 with double distilled water before use.

In any case the **ready-to-use** standards provided should be determined twofold. When samples in great quantities are determined, the standards should be pipetted once before the samples and once after the samples. For final interpretation the arithmetic mean is used for calculation.

In consideration of GLP and quality control requirements a duplicate measurement of samples is recommended.

The procedure is according to the following scheme:

1. Prepare samples as described above.
2. Pipet 100 µL **ready-to-use** standards or prepared samples in duplicate into the appropriate wells of the microtiter plate.
3. Incubate for 20 minutes at room temperature.
4. Wash the plate three times as follows: Discard the contents of the wells (dump or aspirate). Pipet 300 µL of diluted washing solution into each well. After the third repetition empty the wells again and remove residual liquid by striking the plate against a paper towel. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbencies.
5. Pipet 100 µL of conjugate (anti-mustard-peroxidase) into each well.
6. Incubate for 20 minutes at room temperature.
7. Wash the plate as outlined in 4.
8. Pipet 100 µL of substrate solution into each well.
9. Allow the reaction to develop in the dark (e.g. cupboard or drawer; the chromogen is light-sensitive) for 20 minutes at room temperature.
10. Stop enzyme reaction by adding 100 µL of stop solution (0.5 M H₂SO₄) into each well. The blue colour will turn yellow upon addition.
11. After thorough mixing, measure absorbance at 450 nm (reference wavelength 620 nm), using an ELISA reader. The colour is stable for 30 minutes.

9. CALCULATION OF RESULTS

The ready-to-use standards are prepared for a direct determination of sample concentrations. The dilution of samples in the extraction process as described in the above stated sample preparation procedure is already considered. Additional dilution due to high sample concentration has to be accounted for.

1. Calculate the average optical density (OD 450 nm) for each set of reference standards or samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean optical density obtained for each reference standard against its concentration in ppm on semi-log graph paper with the optical density on the vertical (y) axis and the concentration on the horizontal (x) axis. Alternatively the evaluation can be carried out by software. In this case the 4-parameter method should be preferred.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration of mustard in ppm from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

10. TYPICAL STANDARD VALUES

The following table contains an example for a typical standard curve. The binding is calculated as percent of the absorption of the 60 ppm standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in each new test.

Mustard (ppm)	% binding of 60 ppm
60	100
20	68
6	38
2	13
0	4

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Mustard test** is 1 ppm. The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Mustard test** is 2 ppm. As matrices can have variable influence on the LOD in specific cases, and the range of matrices that was tested is of course limited, the end user if needed may evaluate its own LOD values depending on the matrices to be analyzed. Alternatively, any results below LOQ should be just reported quantitatively as "< LOQ"

Cross-reactivity

For the following foods no cross-reactivity could be detected:

Adzuki bean	Chestnut	Fenugreek	Macadamia	Rice
Almond	Chia seeds	Flaxseed	Nutmeg	Rye
Apricot	Chicken	Garden cress	Oats	Saccharose
Barley	Chickpea	Garlic, fresh	Onion	Sesame
Bean, white	Chili	Garlic, granulated	Paprika	Shrimps
Beef	Cinnamon	Ginger, ground	Pea	Soy flour
Beef, cooked	Clove	Ginger, fresh	Peach	Soy lecithin
Bovine gelatin	Cocoa	Gliadin	Peanut	Split pea
Brazil nut	Coconut	Goat's milk	Pecan	Sunflower seed
Buckwheat	Cod	Guar gum	Pepper, black	Thyme
Cabbage, white	Coriander	Gum arabic	Pine seed	Tofu
Caraway	Corn	Hazelnut	Pistachio	Tomato
Cardamom	Cow's milk	Horseradish	Poppy	Turkey
Carob gum	Cumin	Kidney bean	Pork	Turmeric
Carrot	Dill	Kiwi	Potato	Walnut
Cashew	Duck	Lamb	Prawn cooked	Wheat
Cayenne	Egg White	Leek	Prawn, raw	
Celery	Egg, dried	Lentil	Pumpkin seed	
Cherry	Fennel	Lupin	Radish	

For the following commodities of the table above the results were between 0.5*LOQ and LOQ of the kit. So, it cannot be completely excluded that these matrices may provide values above the LOQ in specific cases:

Cumin

The following cross reactions were determined:

Black mustard	50%
Brown mustard	59%
Charlock mustard	48%
Rapeseed	59%

Precision

Intra-assay Precision	8 %
Inter-assay Precision	12 %

Linearity

The serial dilution of spiked samples (sausage, salad dressing, instant soup, canned soup, cheese, mixed herbs) resulted in a dilution linearity of 92% - 113%.

Recovery

Mean recovery was determined by spiking samples with different amounts of mustard:

Sausage	96 %
Salad dressing	76 %
Instant soup	83 %
Canned soup	95 %
Cheese	90 %
Mixed herbs	73 %

Note:

The industrial process of food transformation has an impact on proteins which might affect testing performance. For this reason, recovery/cross reactivity may be altered for heat treated samples.

Empfindlichkeit	1 ppm
Wiederfindung	76 – 98 %
Inkubationszeit	60 min

1. ALLGEMEINES

Senf gehört zu den Kohlgewächsen (Brassicaceae) und hat mit ca. 30-35% einen hohen Proteinanteil im Samen. Einige dieser Proteine sind als allergieauslösend bekannt, wie z.B. Sin a 1 und Bra j 1. Diese Proteine sind überwiegend hitzeresistent, was sie stabil gegenüber verschiedenen Produktionsprozessen macht. Neben braunem Senf (*Brassica juncea*) und schwarzem Senf (*Brassica nigra*) findet vor allem gelber Senf (*Sinapsis alba*) seine Verwendung als Bestandteil in vielen Nahrungsmitteln und Nahrungsmittel-Zubereitungen. Für Senfallergiker sind versteckte Senfallergene in Nahrungsmitteln ein kritisches Problem. Schon sehr geringe Mengen von Senf können allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen. Daher müssen Senfallergiker auf den Konsum von Senf oder senfhaltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Aufgrund von Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln wie z.B. bei Wurstwaren, kann bei einigen Lebensmitteln das Vorhandensein von Senfrückständen nicht ausgeschlossen werden. Um diese detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme.

Der **Demeditec Senf Test** stellt ein hoch sensibles Nachweissystem für gelben Senf dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Rückständen in Wurstwaren, Dressings, Suppen, Käse und Gewürzmischungen geeignet. Wegen hoher Kreuzreaktivität zu braunem und schwarzem Senf ist die Detektion dieser Allergene ebenfalls möglich.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Senf Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen Senfprotein gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Senf enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und Senfprotein statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen Senfprotein gerichteter zweiter Antikörper wird in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation wird erneut gewaschen. Eine Substratlösung wird hinzupipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entwickelt wird. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Senfkonzentration ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

Die volle Übereinstimmung mit den folgenden Regeln für eine gute Laborpraxis (GLP) wird zu vertrauenswürdigen Ergebnissen führen:

1. Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden (20°C-25°C).
2. Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Die Erzeugung von Schaum sollte dabei vermieden werden.
3. Wenn mit der Testdurchführung einmal begonnen ist, sollten alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der empfohlenen Zeitgrenzen vollzogen werden.
4. Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien sollten die Flaschen wieder mit ihren Stopfen verschlossen werden. Die Verschlüsse dürfen nicht verwechselt werden!
5. Für jede Probe muss eine separate Einmal-Pipettenspitze verwendet werden, um eine Verschleppung bzw. Kreuzkontamination zu vermeiden.
6. Alle Proben und Standards sollten gleichzeitig getestet werden, so dass die Bedingungen für alle identisch sind.
7. Komponenten von verschiedenen Chargen dürfen nicht verwendet oder gemischt werden.
8. Reagenzien dürfen nach der Verfallszeit nicht benutzt werden.
9. Es sollten ständig die Präzision und die Richtigkeit für die Laborgeräte kontrolliert werden, die man für das Testverfahren benutzt (Mikropipetten, Washer, ELISA-Reader, etc.).

4. GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSVORSCHRIFTEN

1. Im Laboratorium darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.
2. Beim Einsatz von Proben menschlichen Ursprungs müssen Einmalhandschuhe getragen werden.
3. Der Kontakt der Stopp-Lösung mit Haut und Schleimhäuten sollte vermieden werden, da mögliche Reizungen, Verbrennungen oder Vergiftungsgefahr auftreten können. Sollte ein Kontakt entstehen, muss der betroffene Bereich mit ausreichend Wasser abgespült werden.
4. Die Handhabung und die Beseitigung von chemischen Produkten muss nach den Richtlinien für eine gute Laborpraxis (GLP) erfolgen.

5. REAGENZIEN

Der Kit enthält Reagenzien für 96 Bestimmungen. Sie müssen bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfallsdatum ist auf jeder Komponente sowie auf der Verpackung angegeben.

1. **SORB MT** Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar), beschichtet mit Senf-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** Senf Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 2, 6, 20, 60 ppm gelber Senf), rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-Senf-Peroxidase), 15 mL, rot eingefärbt, gebrauchsfertig.
4. **SUB TMB** Substratlösung (TMB), 15 mL, gebrauchsfertig.
5. **STOP SOLN** Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄), 15 mL, gebrauchsfertig.
6. **SAM DIL 10x** Extraktions- und Proben-Verdünnungspuffer (TRIS), 2 x 120 mL als 10x-Konzentrat, rot eingefärbt. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens eine Woche haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
7. **WASH SOLN 10x** Waschlösung (PBS + Tween 20), 60 mL als 10x-Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Der verdünnte Puffer ist bei 4°C mindestens 4 Wochen haltbar. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.
8. Arbeitsanleitung.

6. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND REAGENZIEN

Geräte

- 100 - 1000 µL Mikropipetten
- Messkolben
- Analysenwaage
- Mörser, Mixer
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Ein wiederverschließbarer Plastikbeutel für die Lagerung unbenutzter Streifen

Reagenzien

- bidestilliertes Wasser

7. PROBENVORBEREITUNG

Aufgrund der hohen Gefahr von Kreuzkontaminationen müssen alle verwendeten Arbeitsgeräte wie Spatel, Mörser, Glasgefäße, etc. vor und nach jeder Probe **gründlich gereinigt** werden. Senfproteine können an den Oberflächen haften. Es wird empfohlen, die Reihenfolge der Extraktionen festzuhalten, um eventuelle Kreuzkontaminationen durch Vorextrakte besser identifizieren zu können.

Folgende Probenvorbereitung sollte für alle Arten von festen Proben angewandt werden:

1. Um eine möglichst homogene und repräsentative Probennahme zu gewährleisten, sollten mindestens 5 g Probe in einem Mörser, Schlagmühle etc. fein zermahlen und gut durchgemischt werden.
2. Von dieser Mischung wird 1 g entnommen und in 20 mL **verdünntem** Extraktionspuffer suspendiert. Anschließend wird die Suspension für 15 min in einem vorgeheizten Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.

3. Die Proben werden bei mindestens 2000 g für 10 min zentrifugiert. Sollte sich der Überstand anschließend nicht partikelfrei abtrennen lassen, kann gegebenenfalls noch einmal filtriert werden.
4. Für den Test werden pro Kavität 100 µL partikelfreie Lösung eingesetzt. Sollte das Ergebnis des Tests oberhalb des Messbereichs liegen, kann die Lösung gegebenenfalls mit **verdünntem** Extraktionspuffer weiter verdünnt und erneut bestimmt werden.

Folgende Probenvorbereitung sollte für flüssige Proben angewandt werden:

1 mL flüssige Probe wird in 19 mL verdünntem Extraktionspuffer verdünnt. Anschließend wird die Suspension für 15 Minuten in einem vorgeheizten Wasserbad bei 60°C inkubiert. Die Proben sollten währenddessen alle zwei Minuten geschüttelt werden, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Anschließend wird mit Punkt 3 der Feststoff-Extraktion fortgefahren.

Achtung:

- Um Re-Suspension zu vermeiden, sollte der Extrakt nach dem Zentrifugieren nicht geschüttelt werden.
- Falls, bedingt durch einen hohen Fett-Anteil der Matrix, nach dem Zentrifugieren, eine dritte, obere Phase entsteht, sollte nur die mittlere wässrige Phase für den Test verwendet werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Der Waschpuffer liegt als 10faches Konzentrat vor und muss vor dem Gebrauch 1+9 mit bidestilliertem Wasser **verdünnt** werden.

Die **gebrauchsfertigen** Standards sollten in jedem Fall im Doppelansatz bestimmt werden. Bei größeren Mengen von Proben sollten die Standards einmal vor und einmal nach den Proben pipettiert und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen werden.

Unter Berücksichtigung von GLP und Qualitätsmanagement ist eine Bestimmung der Proben im Doppelansatz zu empfehlen.

Die Testdurchführung verläuft nach dem folgenden Schema:

1. Proben nach Vorschrift vorbereiten.
2. 100 µL **gebrauchsfertige** Standards bzw. vorbehandelte Proben im Doppelansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
3. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Platte wie folgt dreimal waschen: Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Nach der dritten Wiederholung Vertiefungen erneut leeren und Flüssigkeitsreste durch Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch entfernen. Der Waschvorgang ist ein kritischer Schritt. Ungenügendes Waschen führt zu einer geringen Präzision und fälschlicherweise erhöhten Extinktionen.
5. 100 µL Konjugat (anti-Senf-Peroxidase) in die Vertiefungen pipettieren.
6. Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Vertiefungen wie in Punkt 4 beschrieben waschen.
8. 100 µL Substratlösung zugeben.
9. Platte abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
10. Substratreaktion durch Zugabe von 100 µL Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄) beenden.
11. Nach sorgfältigem Mischen erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 30 Minuten stabil.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Für jede Probe bzw. jeden Standard wird die gemittelte Extinktion berechnet.
2. Aus den gemittelten Werten der Standardreihe wird graphisch auf halblogarithmischem Millimeterpapier oder über ein EDV-Programm (4-Parameter-Auswertung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion jedes Standards (y-Achse) wird gegen die Konzentration in ppm (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppm für Senf abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den Senfgehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen Senfgehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

10. TYPISCHE STANDARDKURVE

Die folgende Tabelle enthält ein Beispiel für eine Standardreihe. Die Werte dieser Standardkurve sind nur als Beispiel bestimmt und dürfen nicht an Stelle der in jedem Test neu zu erstellenden Kurve verwendet werden.

Gelber Senf (ppm)	OD % von 60 ppm
60	100
20	68
6	38
2	13
0	4

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Demeditec Senf Tests** beträgt 1 ppm.

Die untere Bestimmungsgrenze des **Demeditec Senf Tests** beträgt 2 ppm.

Da jede Matrix einen unterschiedlichen Einfluss auf die LOD haben kann und die Bandbreite der getesteten Matrices begrenzt ist, sollte im Bedarfsfall für jede zu untersuchende Matrix eine spezifische LOD ermittelt werden. Alternativ können alle Ergebnisse unterhalb der LOQ als quantitativ „< LOQ“ angegeben werden.

Spezifität

Für die folgenden Nahrungsmittel wurde ein negatives Ergebnis und damit keine Kreuzreaktivität festgestellt:

Adzuki Bohne	Gartenkresse	Kiwi	Nelke	Sesam
Aprikose	Rindergelatine	Knoblauch, frisch	Paprika	Shrimps
Bockshornklee	Gerste	Knoblauch, granuliert	Paranuss	Soja-Lecithin
Bohne, weiß	Gliadin	Kokosnuss	Pecannuss	Sojamehl
Buchweizen	Guakernmehl	Koriander	Pfeffer, schwarz	Sonnenblumenkern
Cashew	Gummi arabicum	Kümmel	Pfirsich	Thymian
Cayenne	Hafer	Kürbiskern	Pinienkern	Tofu
Chia-Samen	Haselnuss	Kurkuma	Pistazie	Tomate
Chili	Huhn	Lamm	Porree	Vollei
Cumin	Ingwer, frisch	Leinsamen	Pute	Vollmilch
Dill	Ingwer, gemahlen	Linse	Reis	Walnuss
Eiklar	Johannisbrotkernmehl	Lupine	Rettich	Weißkohl
Ente	Kakao	Macadamia	Rindfleisch	Weizenkörner
Erbse	Kardamom	Maismehl	Rindfleisch, gekocht	Ziegenmilch
Erdnuss	Karotte	Mandel	Roggen	Zimt
Fenchel	Kartoffel	Marone	Saccharose	Zwiebel
Fisch / Dorsch	Kichererbse	Meerrettich	Schälerbse	
Garnele	Kidneybohne	Mohn	Schweinefleisch	
Garnele, gekocht	Kirsche	Muskatnuss	Sellerie	

Für die folgenden Nahrungsmittel der obenstehenden Tabelle waren die Ergebnisse zwischen 0,5xLOQ und LOQ des Test-Kits. Es kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass diese Matrices in Einzelfällen zu Ergebnissen oberhalb der LOQ führen:

Cumin

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

Ackersenf	48%
Brauner Senf (Saat)	59%
Raps (Saat)	59%
Schwarzer Senf (Saat)	50%

Präzision

Intra-Assay Präzision	8 %
Inter-Assay Präzision	12 %

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über fünf Stufen (Wurst, Salatdressing, Trockensuppe, Dosensuppe, Käse, Gewürzmischung) ergab Verdünnungslinearitäten von 92 – 113%.

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Wurst	96 %
Salatdressing	76 %
Trockensuppe	83 %
Dosensuppe	95 %
Käse	90 %
Gewürzmischung	73 %

Es ist zu beachten, dass der industrielle Prozess der Lebensmittelverarbeitung sich auf die Proteine auswirkt, was die Testleistung beeinträchtigen kann. Aus diesem Grund kann die Wiederfindung/Kreuzreaktivität bei hitze-behandelten Proben verändert sein.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta