

Product information

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



Soy ELISA

REF

DESOJE01



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 (Soy-Trypsin-Inhibitor)	16 ppb
Recovery	77-106%
Incubation Time	60 min

1. GENERAL INFORMATION

Soy (*Glycine max*) belongs to the legumes. With 39% the fraction of proteins in soy beans is very high. Many of these proteins are known for being allergenic, such as Gly m1, Glycinin, Kunitz-Trypsin-Inhibitor and Gly m4 which is known to be cross-reactive to birch pollen allergen Bet v1. For this reason soy represents an important food allergen. For soy allergic persons hidden soy allergens in food are a critical problem. Already very low amounts of soy can cause allergic reactions, which may lead to anaphylactic shock in severe cases. Because of this, soy allergic persons must strictly avoid the consumption of soy or soy containing food. Partly undeclared addition of soy as additive in many foods is of particular importance. Cross-contaminations, mostly in consequence of the production process are representing another problem. The chocolate production process is a representative example. For this reason sensitive detection systems for soy residues in foodstuffs are required. Only a few soy proteins are stable to conventional production processes (for example high temperature). For this reason robust indicator proteins are necessary for detection. Soy trypsin inhibitors (STI) are representing such proteins. The **Demeditec Soy ELISA** represents a highly sensitive detection system on the base of STI and is particularly capable of the quantification of soy residues in cookies, cereals, ice cream, chocolate, instant soups and sausage.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Demeditec Soy** quantitative test is based on the principle of the enzyme linked immunosorbent assay. An antibody directed against STI is bound on the surface of a microtiter plate. Soy 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 STI 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 STI and hence the concentration of soy 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 (micro-pipets, 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 found 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-STI antibodies.
2. **CAL 1 – 5** STI Standards (0; 40; 100; 400; 1000 ppb of STI): 5 vials with 2.0 mL each, dyed red, ready-to-use
3. **ENZ CONJ** Conjugate (anti-STI-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. 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)
- Plastic bag to store unused microtiter strips.

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. 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 if necessary.
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 resuspension.
- 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 a longer series of samples is determined, the standards should be pipetted once before the samples and a second time 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-STI-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 ppb 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 STI in ppb from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

The determined amount of STI [ppb] can be used to calculate the amount of the corresponding soy raw product. Therefore the amount of STI has to be multiplied with a conversion factor (F).

The following conversion factors were determined by validation experiments:

Soy Flour, unroasted	52
Soy Flour, roasted	250
Soy Protein Isolate (90%)	440
Soy Milk	3700
Textured Soy (Granulate)	4550
Tofu	7000

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 1000 ppb standard. These values are only an example and should not be used instead of the standard curve which has to be measured in every new test.

STI (ppb)	OD-% of 1000 ppb
1000	100
400	76
100	36
40	19
0	7

11. PERFORMANCE

Sensitivity

The limit of detection (LOD) of the **Demeditec Soy test** is 16 ppb STI.

The limit of quantification (LOQ) of the **Demeditec Soy test** is 40 ppb STI.

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:

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

Kidney bean

The following cross reactions were determined:

Rapeseed	0.00001%
Fenugreek	0.000005%

Precision

Intra-Assay Precision	6 - 8%
Inter-Assay Precision	5 - 13%

Linearity

The serial dilution of spiked samples (cookies, cereals, ice cream, chocolate, instant soup and sausage) resulted in a dilution linearity of 81% - 128%.

Recovery

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

Cookies	106%
Cereals	100%
Ice cream	77%
Chocolate	77%
Instant soup	90%
Sausage	96%

Empfindlichkeit (Soja-Trypsin-Inhibitor)	16 ppb
Wiederfindung	77-106%
Inkubationszeit	60 min

1. ALLGEMEINES

Die Sojabohne (*Glycine max*) gehört zu den Leguminosen und hat mit ca. 39% einen sehr hohen Proteinanteil im Kern. Viele dieser Proteine sind als allergieauslösend bekannt, wie z.B. Gly m1, Glycinin, Kunitz-Trypsin-Inhibitor und das zum Birkenpollenallergen Bet v1 kreuzreagierende Gly m4. Aus diesem Grund stellt Soja ein bedeutendes Nahrungsmittelallergen dar. Für Soja-Allergiker sind vor allem versteckte Sojaallergene in Nahrungsmitteln ein kritisches Problem. Schon sehr geringe Mengen von Soja lösen allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock aus. Aus diesem Grund müssen Sojaallergiker auf den Konsum von Soja oder sojahaltigen Nahrungsmitteln strikt verzichten. Besonders problematisch ist dabei, dass die Sojabohne in sehr vielen Nahrungsmitteln als zum Teil undeklariertes Zusatzstoff eingesetzt wird. Kreuzkontaminationen, meist bedingt durch den Produktionsprozess von Nahrungsmitteln, wie z.B. bei Schokolade, stellen ein zusätzliches Problem dar. Um Spuren von Soja detektieren zu können, bedarf es sensitiver Nachweissysteme. Da nur wenige Soja-Proteine gegenüber den gängigen Produktionsprozessen (z.B. hohe Temperatur) stabil sind, werden für die Detektion von Sojarückständen robuste Indikator-Proteine benötigt, wie z.B. Soja-Trypsin-Inhibitoren (STI). Der **Demeditec Soja Test** stellt ein hochsensibles Nachweissystem auf der Basis von STI dar und ist insbesondere zur Quantifizierung von Sojarückständen in Keksen, Cerealien, Eiscreme, Schokolade, Fertigsuppen und Wurst geeignet.

2. TESTPRINZIP

Der **Demeditec Soja Test** basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Ein gegen STI gerichteter Antikörper ist auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden. Darauf wird die Soja enthaltende Probe bzw. Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen Antikörper und STI statt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünntem Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenes Material zu entfernen. Ein Peroxidase-markierter, gegen STI 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 STI-Konzentration und damit die Sojakonzentration 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 STI-bindenden Antikörpern.
2. **CAL 1 – 5** STI Standards: 5 Fläschchen mit je 2,0 mL (0, 40, 100, 400, 1000 ppb STI), rot eingefärbt, gebrauchsfertig
3. **ENZ CONJ** Konjugat (anti-STI-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 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. 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 durchmischt 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-STI-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 ppb (x-Achse) aufgetragen.
3. Mit Hilfe dieser Kurve wird für die gemittelten Extinktionen der Proben der Wert in ppb für STI abgelesen. Die ermittelten Konzentrationen beziehen sich direkt auf den STI-Gehalt der eingewogenen Probe. Sollte der Extrakt aufgrund eines zu hohen STI-Gehalts zusätzlich verdünnt worden sein, muss dies bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Um aus dem ermittelten STI-Gehalt [ppb] den Gehalt eines zugrundeliegenden Rohprodukts zu erhalten, muss das Ergebnis mit einem entsprechenden Umrechnungsfaktor (F) multipliziert werden.

Die folgenden Umrechnungsfaktoren wurden anhand von Validierungsversuchen ermittelt:

Soja-Mehl, ungeröstet	52
Soja-Mehl, geröstet	250
Soja Proteinisolat (90%)	440
Sojamilch	3700
Texturiertes Soja (Granulat)	4550
Tofu	7000

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.

STI (ppb)	OD-% von 1000 ppb
1000	100
400	76
100	36
40	19
0	7

11. TECHNISCHE DATEN

Empfindlichkeit

Die mittlere untere Nachweisgrenze des **Demeditec Soja Tests** beträgt 16 ppb STI.

Die untere Bestimmungsgrenze des **Demeditec Soja Tests** beträgt 40 ppb STI.

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:

Aprikose	Garnele, roh	Kartoffel	Linse	Pinienkern	Senf
Bohne, weiss	Gartenkresse	Kerbel	Lupine	Pistazie	Sesam
Buchweizen	Gerste	Kichererbse	Macadamia	Porree	Shrimps
Cashew	Gliadin	Kidneybohne	Maismehl	Pute	Sonnenblumenkern
Cayennepfeffer	Guakernmehl	Kirsche	Mandel	Raps	Thymian
Chia	Gummi arabicum	Kiwi	Marone	Reis	Tomate
Chili	Hafer	Knoblauch, frisch	Meerrettich	Rettich	Vollei
Cumin	Haselnuss	Knoblauch, granuliert	Mohn	Rindergelatine	Vollmilch
Dill	Hausenblase	Kokosnuss	Muskat	Rindfleisch	Walnuss
Ente	Huhn	Krabbe, gekocht	Nelke	Rindfleisch, gekocht	Weißkohl
Erbse	Ingwer, frisch	Krabbe, roh	Paprika	Roggen	Weizenkörner
Erdnuss	Ingwer, gemahlen	Kümmel	Paranuss	Saccharose	Ziegenmilch
Fenchel	Johannisbrotkernmehl	Kürbiskern	Pecannuss	Schafsmilch	Zimt
Fisch / Dorsch	Kakao	Kurkuma	Pfeffer	Schälerbse	Zwiebel
Fischgelatine	Kardamon	Lamm	Pfirsich	Schweinefleisch	
Garnele, gekocht	Karotte	Leinsamen	Pflaume	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 Matri-zen in Einzelfällen zu Ergebnissen oberhalb der LOQ führen:

Kidneybohne

Folgende Kreuzreaktionen wurden festgestellt:

Raps	0,00001%
Bockshornklee	0,000005%

Präzision

Intra-Assay Präzision	6 - 8%
Inter-Assay Präzision	5 - 13%

Linearität

Die schrittweise Verdünnung dotierter Proben über vier Stufen (Kekse, Cerealien, Eiscreme, Schokolade, Fertigsuppe, Wurst) ergab mittlere Verdünnungslinearitäten von 81 – 128%.

Wiederfindung

Die folgenden mittleren Wiederfindungsraten wurden anhand aufgestockter Proben bestimmt:

Kekse	106%
Cerealien	100%
Eiscreme	77%
Schokolade	77%
Fertigsuppen	90%
Wurst	96%

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
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	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 advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	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