

INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, S.A.



INGEZIM GLUTEN Quick

Prod Ref: 30.GL2.K2

Ensayo inmunoenzimático de doble anticuerpo para la detección y cuantificación de gluten en alimentos

Double antibody sandwich immunoenzymatic assay for quantitative analysis of gluten in food samples

Última revisión / Last revision: 30-04-2018

INGEZIM GLUTEN Quick
30.GL2.K2
COMPOSICION DEL KIT
KIT COMPOSITION

Reactivo Reagent	1 placa (1x8x12 pocillos) 1 plate box (1x8x12 wells)	
	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación (8x12 pocillos) recubierta con un ACM de gliadinas, secalinas y hordeinas 96 well microtitration plates (12x8 wells) coated with a gliadin, secalin, and hordein-specific Mab	1	
Estandar europeo de gliadina a las concentraciones de 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml y 3,12 ng/ml listos para su uso Vials with Gliadin European Standard containing solutions of 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml and 3.12 ng/ml ready to use	5	1,5 ml
Control negativo, listo para su uso. Negative control, ready to use.	1	1.5 ml
AcM anti gliadina, secalina, hordeina, conjugado con peroxidasa, listo para su uso. Vials with an anti-gliadin, secalin and hordein Mab-peroxidase conjugate, ready to use.	1	15 ml
Tampón de extracción, listo para su uso Bottles with extraction buffer, ready to use.	1	110 ml
Solución de lavado (25 x concentrado) Bottles with Washing solution (25x concentrated)	1	65 ml
Diluyente (DE12-05) (5x concentrado) Bottles with Diluent (DE12-05) (5x concentrated)	1	65 ml
Sustrato (TMB) Bottles with Substrate (TMB)	1	15 ml
Solución de frenado (H ₂ SO ₄ 0,5M) Bottles with Stop Solution (H ₂ SO ₄ 0,5M)	1	15 ml

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT
 OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT:

Etanol
 Agua Destilada

Ethanol
 Distilled water

I. FUNDAMENTO TECNICO DEL KIT

Ingezim gluten es un inmunoensayo enzimático Sándwich de doble anticuerpo. Sobre un soporte de poliestireno recubierto con el **anticuerpo monoclonal R5 (AcM) que reconoce específicamente gliadinas, secalinas y hordeínas**, se añade la muestra. En el caso de que contenga gluten, estas proteínas serán capturadas y quedarán fijadas al pocillo. Tras un paso de lavado para eliminar el material no adherido se añade el mismo AcM (R5), esta vez conjugado con peroxidasa, que se unirá a las

gliadinas anteriormente fijadas. Tras otro paso de lavado la presencia del AcM peroxidasa se detecta tras la adición de un sustrato adecuado a la peroxidasa (TMB) que producirá una reacción colorimétricamente medible.

Con Ingezim Gluten es posible cuantificar la cantidad de gluten de una muestra con un límite de detección de 3ng/mg de alimento (3 ppm).

II. PRECAUCIONES

1. Leer atentamente las instrucciones de uso
2. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización.
3. No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
4. Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
5. No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
6. No comer, beber ni fumar mientras se manipulan los reactivos y/o las muestras.
7. No pipetear los reactivos con la boca.
8. Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
9. Incluir sistemáticamente los puntos de la curva patrón siempre que se utilice el kit.
10. **¡IMPORTANTE!** : El sustrato es muy sensible a la luz y a las contaminaciones. Retirar del bote de sustrato únicamente el volumen que vaya a utilizarse y nunca devolver el sobrante al bote.
11. La solución de frenado ha de ser manipulada con precaución ya que es un ácido fuerte.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

- ✓ Todos los componentes deben ser almacenados entre +2°C y +8°C. **NO CONGELAR NINGUNO DE ELLOS.**
- ✓ Evitar la exposición del kit y los componentes a la luz del sol, ya que algunos reactivos son sensibles a ella.

IV. INFORMACION SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un frasco lavador, un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Agitar delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

V. PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

- **Conjugado, control negativo y puntos de la curva patrón**

Se encuentran listos para usar y no precisan de ningún tratamiento. Añadir 100 µl de cada solución directamente al pocillo.

- **Solución de lavado**

Diluir un volumen de solución concentrada en 24 volúmenes de agua destilada. Una vez

preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

- **Diluyente**

Diluir un volumen de solución concentrada en 4 volúmenes de agua destilada. Una vez preparada, la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.

VI. PREPARACION DE LA MUESTRA

Muestras procesadas por calor o que contengan soja:

1. Pesar 0.25 g de la muestra de alimento molido y depositarlo en un tubo de 10 ml.
2. Añadir al tubo 2.5 ml del tampón de extracción.
3. Cerrar los tubos con el tapón rosca/presión y sellarlos con papel parafilm para evitar evaporación.
4. Mezclar en el vortex (5-10 segundos)
5. Incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación). Se recomienda agitar la mezcla algunas veces durante la incubación.
6. Añadir 7.5 ml de etanol al 80%, agitar con vortex durante 10-60 segundos e incubar de 20 a 60 min a temperatura ambiente **con agitación** (como en el caso anterior, los datos no varían a partir de los 20 min de incubación). Se recomienda un agitador rotatorio a 45 revoluciones por minuto.
7. Centrifugar a 2000-2500 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
8. Pasar el sobrenadante a tubos limpios y a continuación analizarlos por ELISA.

Muestras no procesadas por calor y que no contengan soja.

1. Pesar 0.25 g de la muestra de alimento molido y depositarlo en un tubo de propileno de 10 ml.
2. Añadir 10 ml de etanol al **60%** e incubar de 20 a 60 min a temperatura ambiente **con agitación**
3. Centrifugar a 2000-2500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Pasar el sobrenadante a tubos limpios de propileno y a continuación analizarlos por ELISA.

Muestras que contengan taninos o polifenoles (chocolate, vino tinto, zumos de frutas coloreados...)

1. En un tubo de propileno de 10 mL, pesar 0.25 g de gelatina y 0.1 g de Polyvinil-pyrrolidone. (Polyvinilpyrrolidone Sigma PVP-360) (Gelatina de pescado Sigma No. G-7041).
2. Pesar 0.25 g de muestra del alimento molido y añadirlos al tubo.

3. Añadir 2.5 mL de Tampón de Extracción.
4. Cerrar los tubos y sellarlos con parafilm para evitar la evaporación debida al calor.
5. Mezclar con vortex hasta que la muestra esté completamente mezclada.
6. Incubar los tubos de 20 a 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación).
7. Añadir a la muestra 7.5 mL de Etanol al 80% e incubar de 20 a 60 min a temperatura ambiente **con agitación**, (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación).
8. Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 2000-2500 g a temperatura ambiente.
9. Recoger el sobrenadante en tubos de propileno de 10 ml limpios.
10. Estos extractos en Tampón de extracción-gelatina han de almacenarse a temperatura ambiente.

Muestras de superficie (tomadas con torunda)

IMPORTANTE: este procedimiento sólo sirve para tener una idea de la posible presencia/ausencia de gluten en una superficie.

Con las muestras tomadas con torunda no es posible cuantificar, ya que no sabemos de qué cantidad de muestra partimos.

Teniendo en cuenta que con la torunda se coge poca cantidad de muestra, el procedimiento es igual que el normal, pero usando menores volúmenes de solución de extracción y etanol (manteniendo siempre la misma proporción que el tratamiento original).

1. Una vez tomada la muestra, cortar la torunda e introducirla en un tubo de propileno de 10 mL.
2. Añadir al tubo 1mL de Solución de Extracción.
3. Cerrar el tubo con el tapón/rosca a presión y sellarlo con parafilm para evitar la evaporación.
4. Mezclar en el vortex (5-10 segundos).
5. Incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación).
6. **Sin sacar la torunda**, añadir 3mL de etanol al 80%, agitar con vortex durante 10-60 segundos e

incubar entre 20 y 60 min a temperatura ambiente (los datos no cambian significativamente a partir de los 20 min de incubación), **con agitación**.

7. Sacar la torunda y analizar en el ELISA las diluciones 1/12.5 y 1/25 de la solución resultante.
8. Comparar los valores de Densidad Óptica de dichas diluciones con el estándar inferior proporcionado con el kit, para poder tener una idea de la posible presencia/ausencia de gluten en la muestra de superficie analizada (considerando siempre el Límite de Detección del Ensayo)

INDICACIONES GENERALES

El extracto se puede conservar durante 7 días a temperatura ambiente, y hasta 1 mes a 4°C.

Durante el almacenamiento se recomienda sellar perfectamente los tubos con parafilm, para evitar la evaporación del etanol.

La muestra ya preparada se diluirá según los siguientes criterios:

- Para muestras con niveles de gluten esperables menores de 10 ppm de gluten se recomiendan la dilución 1/12.5
- Para el resto de las muestras hasta 100 ppm se recomiendan la dilución 1/25
- Para muestras con contenidos de gluten superiores a 100 se recomienda la dilución 1/50.

Se recomiendan las siguientes formas de realizar las diluciones propuestas:

1/12.5 = 920µl diluyente + 80µl muestra

1/25 = 960µl diluyente + 40µl muestra

1/50 = 980µl diluyente + 20µl muestra

En general, para muestras desconocidas, se recomienda la dilución 1/25.

VII. PROCEDIMIENTO

1. Antes de comenzar el ensayo equilibrar todos los componentes del kit, al menos 30 min a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de cada muestra diluida según instrucciones anteriores (se recomienda hacerlo por duplicado). Dispensar seguidamente 100 µl de los puntos de la curva patrón y del control negativo.
Tapar la placa e incubar **20 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)**.
3. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
4. Añadir 100µl de conjugado, en cada pocillo. Mantener **20 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar en lo posible este proceso.
5. Lavar 3 veces según procedimiento descrito anteriormente.
6. Añadir 100 µl de sustrato por pocillo. Mantener la reacción **20 minutos a temperatura ambiente**. Se recomienda la utilización de una pipeta multicanal a fin de agilizar en lo posible este proceso.
7. Añadir 100 µl de solución de frenado, con objeto de parar la reacción. Se recomienda añadir este reactivo en el mismo orden en que se añadió el sustrato. En caso de reacción positiva la solución de frenado provocará el cambio de color de azul a amarillo.
8. Leer los valores de absorbancia a 450 nm en los 5 min siguientes a la adición de la solución de frenado.

VIII. LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS:

La lectura se realizará a 450nm

Validación del test:

El test se considerará válido la DO 450 nm del punto de 50 ng/ml sea superior a 1.5 y la absorbancia del control negativo sea inferior al punto de 3.12 ng/ml.

Interpretación de los resultados:

El contenido de gluten de la muestra se cuantifica de la siguiente manera:

- Construir la curva patrón (ver ejemplo)
- Determinar la concentración de gliadina de la muestra interpolando su valor de absorbancia en dicha curva (ver ejemplo).
- Con este dato aplicar la siguiente fórmula para determinar la cantidad de gluten en la muestra:

$$\text{ppm de gluten} = C \times D \times 2 \times 40 / 1000$$

C: es la concentración de gliadina de la muestra determinada en la curva

D: es el factor de dilución de la muestra (12.5, 25, 50, etc).

2: factor que se aplica para convertir gliadina en gluten.

40: factor que se aplica porque 0.25g de alimento son extraídos con 10 ml de solución de extracción

1/1000: factor que procede de la conversión de ng/ml en ppm.

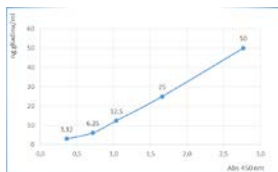
INFORMACION ADICIONAL

- Para que los cálculos realizados sean correctos, los valores de absorbancia de las muestras deben estar incluidos dentro de la curva. En caso contrario se debe repetir el ensayo con otras diluciones de la muestra.
 - Sólo en el caso en el que el valor de absorbancia obtenido sea ligeramente superior al punto de 50 ng/ml (hasta un 15%) podrá darse por válido el ensayo

EJEMPLO:

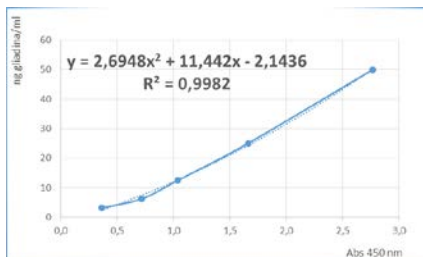
- 1) DO del control negativo = 0.113
- 2) DO de los puntos de la curva:

ng/ml	Abs450
50	2.768
25	1.660
12.5	1.039
6.25	0.717
3.12	0.361



3) La concentración de gliadina de la muestra (C) se puede interpolar de la curva patrón usando el software apropiado. Por ejemplo:

- ✓ Software: Excel (Microsoft)
- ✓ Seleccionar tanto las concentraciones como las DO obtenidas y pinchar en " asistente para gráficos"
- ✓ Selecciona tipo de gráfico: "XY (dispersión)" y "terminar"
- ✓ Pinchar en la ventana superior "Gráfico" y seleccionar " Agregar línea de tendencia"
- ✓ En el nivel "Tipo", seleccionar "Polynomial"
- ✓ En el nivel "Opciones", seleccionar "Presentar ecuación en el gráfico".
- ✓ En esta ecuación sustituir la X por la DO de la muestra para obtener el valor "C"



Muestra	Dilución(D)	DO	ng/ml (C)*	Ppm gluten
1	12.5	0.21	< 3.12	< 3
2	12.5	0.500	4	4
3	25	0.893	10	20
4	25	2.817	51.5	103
5	50	2.532	44	176

*Obtenido reemplazando DO de la muestra por el X en la ecuación de la línea de tendencia

IX. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO:

1. Los reactivos deben almacenarse a temperatura ambiente (**22-25°C**) antes de comenzar.
2. Añadir 100 µl de **muestra** (preparada y diluida tal y como se describe en el punto VI), por duplicado.
3. Añadir 100 µl de los **estándares** y del **control negativo**. Tapar la placa.
4. Incubar a temperatura ambiente (**22-25°C**) durante 20 minutos.
5. Lavar los pocillos 3 veces con **solución de lavado diluida** para eliminar los reactivos no unidos.
6. Añadir 100 µl de Anticuerpo Monoclonal **Conjugado** con Peroxidasa a cada pocillo. Cubrir la placa.
7. Incubar a temperatura ambiente (22-25°C) durante 20 minutos.
8. Lavar los pocillos 3 veces con **solución de lavado diluida** para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
9. Añadir 100 µl de **substrato (TMB)** a cada pocillo.
10. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Añadir 100 µl de **solución de frenado** a cada pocillo.
12. Leer a 450 nm.

I. TECHNICAL BASIS

This kit is based on a double antibody sandwich enzyme immunoassay (DAS or capture Elisa). The technique is briefly described below:

The plate is coated with the **R5 monoclonal antibody (Mab)**, which specifically recognises a common epitope to gliadins, secalins and hordeins. Therefore, when a sample is added into the wells, the capture Mabs will bind to the existing gliadins in the sample. After a washing step a second R5 Mab specific to gliadin conjugated with Peroxidase is added.

This conjugated Mab will bind to the captured gliadins and after a further washing step the

peroxidase action will be detected by adding the TMB substrate. The change from a colourless substrate solution into a blue product and, after addition of stop solution, into a yellow colour, can be measured with an ELISA reader.

The content of gliadin in the samples will be determined by an interpolation of their OD values in the calibration curve, done with the gliadin standards supplied with the kit. The sensitivity of the assay is 3 ppm of gluten.

II. PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS:

1. Read the use instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (22°-25°C) prior to use.
3. Do not mix reagents or use instructions from different kits.
4. Avoid any contamination of the kit reagents.
5. Do not use components after expiry dates and do not mix components from different lots.
6. There should be no eating, drinking, or smoking while handling reagents or samples.
7. Do not pipette by mouth.
8. Use a new tip for each new sample.
9. Systematically include the controls and the standard curve each time the assay is run.
10. **IMPORTANT** The TMB Substrate must be handled with care as it is very sensitive to light and contamination: pipette from the substrate storage bottle a sufficient amount for the assay into a separate dark container prior to the colour development step.
11. The stop solution is a strong acid and therefore must be handled with care.

III. STORAGE OF THE KIT COMPONENTS:

- ✓ All components must be stored between +2°C and +8°C. **DO NOT FREEZE ANY OF THE KIT COMPONENTS.**
- ✓ Avoid exposure of the kit and the components to direct sunlight at any time, as some reagents are light sensitive.

IV. INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS:

The steps can be done using a squeeze bottle, an automatic plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl on each well. After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over, in order to avoid the possible exchange of contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 µl of washing solution in each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.
- Repeat the process as many times as are indicated in the kit instructions.
- Prior to emptying the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to be used. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After the last washing step tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

V. PREPARATION OF REAGENTS:

Washing solution:

Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit with 24 parts of distilled or deionized water. Once prepared, this solution remains stable when stored at +4°C.

Dilution buffer:

Dilute one part of the concentrated dilution buffer provided in the kit with 4 parts of

distilled or deionized water. Once prepared, this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C.

Conjugate, Negative Control and Standards:

They are supplied ready to use. Do not dilute. Add 100 µl of each reagent directly to the well.

VI. SAMPLES PREPARATION:

Extraction procedure for Heat-processed products or products containing Soya.

1. Weigh 0.25 g of a milled food sample and place it in a 10 ml tube.
2. Add 2.5 ml of the Extraction buffer to the tube containing the sample.
3. Close the tube tightly and cover the cap with parafilm to avoid evaporation.
4. Mix thoroughly by vortexing (5-10 seconds) and place the tubes in a rack.
5. Incubate the tubes between 20 and 60 minutes at room temperature. During this incubation period, vortex the sample 2-3 times.
6. Open the tubes, add 7.5 ml of 80% ethanol. Thoroughly disperse the samples by vortexing 10 to 60 seconds and incubate 20-60 minutes at room temperature **with agitation** (a rotatory shaker at 45 turns per minute is recommended).
7. Centrifuge the tubes for 10 min at 2000-2500g at room temperature
8. Transfer the supernatants to clean 10 ml tubes. The solution is now ready for running an ELISA.

Extraction procedure for Non Heat-processed products and non-containing Soya products.

1. Weigh 0.25 g of a milled food sample and place it in a 10 ml tube.
2. Add 10 ml of **60%** ethanol and incubate for 20-60 minutes at room temperature **with agitation**.
3. Proceed to step 7 of the *heat processed products extraction procedure*.

Extraction of samples containing tannins or polyphenols (chocolate, red wine, fruit juices..)

1. In a 10 mL propylene tube, weight 0.25 g of Gelatin and 0.1 g of Polyvinyl-pyrrolidone. (Polyvinylpyrrolidone Sigma PVP-360) (Fish Gelatine Sigma No. G-7041).
2. Weight 0.25 g of the milled food sample and add it to the tube.
3. Add 2.5 mL of Extraction Buffer
4. Close the tubes and seal them with parafilm in order to avoid evaporation due to heat.
5. Mix by vortex until the sample is completely mixed.
6. Incubate tubes between 20 and 60 minutes at room temperature.
7. Add 7.5 mL of 80% Ethanol to the sample and incubate between 20 and 60 minutes at room temperature **with agitation** (a rotatory shaker at 45 turns per minute is recommended).
8. Centrifugate the samples 10 minutes at 2000-2500 g at Room Temperature.
9. Collect the supernatant into clean 10 mL propylene tubes.
10. These extracts should be stored at Room Temperature.

EXTRACTION OF SWAB SAMPLES

IMPORTANT: *this procedure can only be used for a qualitative detection of gluten (absence/presence) in a surface sample.*

Swab samples should not be used for quantification, as the initial amount of sample in the swab is unknown.

Considering that using a swab only a little amount of sample can be taken, the extraction procedure is similar than the "normal" one, but using less volume of Extraction Buffer and Ethanol (as long as the original proportion is maintained):

1. Once the sample has been taken, cut the tip of the swab and put it into a 10mL propylene tube.
2. Add 1mL of Extraction Buffer to the tube.
3. Close the tube tightly with the cap and seal it using Parafilm in order to avoid evaporation.
4. Vortex for 5-10 seconds.
5. Incubate between 20 and 60 minutes at room temperature.
6. Add 3mL of Ethanol (80%), vortex for 10-60 seconds and between 20 and 60 minutes at room temperature **with agitation**. IMPORTANT: do not remove the swab from the tube at this step.
7. Remove the swab after the incubation and use the solution for the ELISA (dilutions 1/12.5 and 1/25).
8. Compare the OD values of both dilutions with the OD of the lower standard, in order to have an idea about the absence/presence of Gluten on the sample surface. The results should be

reported considering the Limit of Detection of the assay (3ppm of Gluten)

GENERAL INDICATIONS

The extracted samples may be kept 7 days at room temperature (or 1 month at 4°C), before performing the ELISA test. While stored, close tightly the vials with parafilm in order to avoid evaporation.

The samples should be diluted as follows before adding to the ELISA plate wells:

- 1) Samples with estimated gluten contents lower than 10 ppm: make a 1/12.5 dilution, using the supplied diluent.
- 2) Samples with gluten contents between 10-100 ppm: make 1/25 dilutions.
- 3) Samples with gluten contents over 100 ppm: make 1/50 dilutions.

Dilution procedure:

1/12.5 = 920µl of diluent+80µl of sample

1/25 = 960µl of diluent+40µl of sample

1/50 = 980µl of diluent+20µl of sample

In general, for samples with unknown gluten content, we recommend a 1:25 dilution

VII. TEST PROCEDURE:

1. Prior to starting the test, equilibrate all reagents to room temperature (22-25°C).
2. Add 100 µl of sample dilutions. We recommend the use of two wells per diluted sample. Add 100 µl of standards and negative control. Seal the plate and **incubate 20 minutes at room temperature (22-25°C)**.
3. Wash 3 times following the procedure previously described in point IV (Washing steps).
4. Using a multi-channel pipette, add 100 µl of the ready to use conjugate to each well. Seal the plate and **incubate 20 minutes at room temperature (22-25°C)**.
5. Wash 3 times following the procedure previously described.
6. Using a multi-channel pipette, add 100 µl of TMB substrate to each well. Keep the plate for **20 min at room temperature**
7. Add 100 µl of the stop solution to each well in the same order in which the substrate was added. A positive reaction will change the colour from blue to yellow.
8. Read the OD of each well at 450 nm within the following 5 min after the addition of the stop solution.

VIII. READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Validation of the test

The test can be considered valid when:

- ⇒ The OD of the 50 ng/ml standard point is higher than 1.5 and the OD of the Negative Control is lower than the 3,12 ng/ml point.

Interpretation:

The OD of the sample must be calculated as the arithmetic mean of the duplicated OD values.

Plot the calibration curve using the mean of the OD values obtained for the five standards (abscises) and their corresponding ng/ml values (ordinate).

Determine the concentration of gliadin in the sample (C) by interpolating the absorbance value of the sample in the curve.

The content (ppm) of gluten in a sample will be calculated as follows:

$$\text{ppm of gluten} = C \times D \times 2 \times 40 / 1000$$

where:

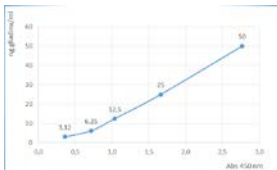
- C:** is the concentration of gliadin in the sample calculated from the calibration curve in ng/ml.
- D:** is a dilution factor of the sample (12.5, 25, 50)
- 2:** is a factor applied in order to express the results as concentration of gluten (instead of gliadin)
- 40:** is the dilution factor applied in the sample preparation (0,25g in 10 ml of extraction solution).
- 1/1000:** is the conversion rate from ng/ml to ppm

ADDITIONAL INFORMATION

- To ensure that the calculations obtained are correct, the OD values of the samples should be within the range of the OD values of the standard curve. It may be necessary to repeat the test using different dilutions of the samples to achieve these results. If so, it is important to apply the dilution factor in the calculation of results order to obtain correct values.
- Only in the case that the OD value of the sample is slightly higher than the OD of the 50 ng/ml point (up to a 15%), the assay can be considered as valid.

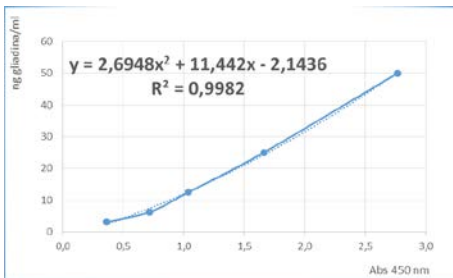
EXAMPLE:

- 1) OD of Negative Control = 0,13
- 2) OD of the standards points:



ng/ml	Abs450
50	2.768
25	1.660
12.5	1.039
6.25	0.717
3.12	0.361

- 3) The concentration of gliadin (C) in the sample can be obtained by extrapolating the OD value of the sample in the standard curve or by using an appropriate software. For example:
- ✓ Software: Excel (Microsoft)
 - ✓ Once obtained the gliadin standards OD values, click on "Graphic assistant"
 - ✓ Select type of chart: "XY (dispersion)"
 - ✓ Click on the top window "chart" and then select "Add tendency line"
 - ✓ In the tab "type", click on "polynomial"
 - ✓ In the tab "Options", click on "Display the formula in the chart"
 - ✓ In this equation, replace the unknown factor "x" by the sample OD value.



Sample	Dilution(D)	DO	ng/ml (C) *	Ppm gluten
1	12.5	0.21	< 3.12	< 3
2	12.5	0.500	4	4
3	25	0.893	10	20
4	25	2.817	51.5	103
5	50	2.532	44	176

* Obtained by replacing "x" by the OD value in the tendency line.

OVERVIEW OF PROCEDURE

1. Reagents must be equilibrated at room temperature **(22-25°C)** prior to starting the test.
2. Add 100µl of the **samples** (prepared and diluted as described in point VI) in duplicate wells.
3. Add 100µl of **standards** and **negative control**. Seal the plate with adhesive foil.
4. Incubate at room temperature **(22-25°C)** for 20 min.
5. Wash the wells 3 times with the *diluted wash* solution to remove unbound reagents.
6. Add 100µl of *Mab Peroxidase Conjugated* to each well. Seal with adhesive foil.
7. Incubate at room temperature **(22-25°C)** for 20 min.
8. Wash the wells 3 times with the *diluted wash* solution to remove nonreactive conjugate.
9. Add 100µl of **substrate (TMB)** to each well.
10. Incubate **20min** at room temperature
11. Add 100µl of stop solution to each well.
12. Read at 450nm.





Desarrollado y fabricado en España por:
Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
C/ Hnos. García Noblejas, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tlf: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.com
www.ingenasa.es



IT-73840
IT-73780



ISO 14001:2015
9191.INGE



ISO 9001:2015
9175.ING2

Distributed in

by:

