

RIDASCREEN[®] Melengestrolacetat

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Melengestrolacetat

Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of
melengestrol acetate

Art. No.: R6502

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
Landwehrstr. 54
D-64293 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

RIDA[®] und RIDASCREEN[®]
sind eingetragene Warenzeichen 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

Der RIDASCREEN® Melengestrolacetat (Art. Nr.: R6502) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Melengestrolacetat in perirenalem Rinderfett und Muskelfleisch.

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

Ein Testkit ist ausreichend für 48 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung benötigt man ein Mikrotiterplatten-Photometer.

Probenvorbereitung: Extraktion über Nacht
zentrifugieren, evaporieren, einfrieren, zentrifugieren
Chromatographische Reinigung mit
RIDA® C18 columns (Art. Nr.: R2002)

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)ca. 18 h
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 2 h 30 min

Nachweisgrenze: Rindernierenfett0,3 ppb
Muskelfleisch0,075 ppb

Wiederfindungsrate: in künstlich dotierter Negativkontrolle
Rindernierenfettca. 65 %
Muskelfleischca. 74 %

Spezifität: Die Spezifität des RIDASCREEN® Melengestrolacetat wurde durch Bestimmung der Kreuzreaktivität zu entsprechenden Substanzen ermittelt.

Melengestrolacetat (MLGA) 100,0 %
Megestrolacetat (MGA) 10,0 %
Medroxyprogesteronacetat (MPA) 6,6 %
6 α -Methyl-17 α -OH-Progesteronacetat 5,2 %
Chlormadinonacetat (CMA) 4,8 %
17 α -Acetoxyprogesteron 3,9 %
16 α -Methylprogesteron 0,0035 %

alle weiteren getesteten Verbindungen
zeigen eine Kreuzreaktion von $\leq 0,003$ %

1. Verwendungszweck

Der RIDASCREEN® Melengestrolacetat-Test ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Melengestrolacetat in perirenalem Rinderfett und Muskelfleisch. Der Test ist auf die Kontrolle von Fleischimporten aus den USA und Kanada und auf die aktuelle Rechtslage abgestimmt.

2. Allgemeines

Synthetische Gestagene werden einerseits eingesetzt, um nach deren Entzug einen synchronisierten Eisprung bei Zuchtrindern zu erzielen und die Fertilität zu verbessern, andererseits ist eines dieser synthetischen Gestagene, Melengestrolacetat (MLGA) ein zugelassener wachstumsfördernder Futtermittelzusatz für Färsen in den USA und Kanada. Die festgelegte Dosis beträgt 0,5 mg pro Tier und Tag und wird als Futtermischung verabreicht. Die anabole Wirkung von MLGA ist nicht geklärt, aber eine Stimulierung der Synthese des endogenen anabolen Steroids Estradiol ist bekannt und über evtl. androgene Nebeneffekte wird spekuliert. MLGA gehört zu den aktivsten synthetischen Gestagenen und seine orale Bioaktivität liegt 10 oder 100 mal höher als die der Gestagene Chlormadinonacetat (CMA) oder Medroxyprogesteronacetat (MPA). Parenteral gegeben liegt die hormonelle Aktivität 125 mal höher als die von Progesteron. Aufgrund seiner sehr lipophilen Eigenschaften reichert es sich im Vergleich zum Blutplasma ca. 200fach im Fett an.

Seit 1988 ist der Einsatz von Sexualhormonen als Wachstumsförderer in der EU generell verboten und so auch der Import von Fleisch hormonbehandelter Tiere.

3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit Fänger-Antikörpern gegen anti-MLGA-Antikörper beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung, enzymmarkiertes MLGA (Enzymkonjugat) und anti-MLGA-Antikörper. Freies und enzymmarkiertes MLGA konkurrieren um die MLGA-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Gleichzeitig werden die anti-MLGA-Antikörper von den immobilisierten Fänger-Antikörpern gebunden. Nicht gebundenes, enzymmarkiertes MLGA wird anschließend in einem Waschschriff wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat (Harnstoffperoxid) und Chromogen (Tetramethylbenzidin). Gebundenes Enzymkonjugat wandelt das farblose Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe des Stopp-Reagenzes führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.

Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zu der Melengestrolacetat-Konzentration in der Probe.

4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 48 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jeder Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 48 Kavitäten (6 Streifen à 8 Einzelkavitäten)
beschichtet mit Fänger-Antikörpern
- 6 x MLGA-Standardlösungen, je 1,3 ml
0 ppb (Nullstandard), 0,15 ppb, 0,45 ppb, 1,35 ppb, 4,05 ppb, 12,15 ppb
MLGA in wässriger Lösung, gebrauchsfertig
- 1 x Konjugat (0,7 ml)roter Verschluss
Peroxidase-konjugiertes MLGA
Konzentrat
- 1 x Anti-MLGA-Antikörper (0,7 ml)schwarzer Verschluss
Konzentrat
- 1 x Substrat (7 ml)grüner Verschluss
enthält Harnstoffperoxid
- 1 x Chromogen (7 ml)blauer Verschluss
enthält Tetramethylbenzidin
- 1 x Stopp-Reagenz (14 ml) gelber Verschluss
enthält 1 N Schwefelsäure
- 1 x Puffer (25 ml)
Konjugat- und Antikörperverdünnungspuffer

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Geräte:

- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Gefrierschrank (-60 °C)
- Wasserbad (40 °C und 60 °C)
- Ultraturrax
- Kühlzentrifuge
- Messpipetten
- variable 20 µl-, 50 µl-, 100 µl-, 200 µl- und 1000 µl Mikropipetten
- RIDA® C18 columns (Art. Nr.: R2002)

5.2. Reagenzien:

- Petrolether
- Methanol
- Methanol/20 mM Tris-HCl (20/80 (v/v)): 2,42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ad ca. 700 ml dest. Wasser + 200 ml Methanol (100 %), pH 8,5 mit ca. 5 M HCl einstellen und auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen
- 67 mM Phosphatpuffer, pH 7,2: 1,79 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 9,61 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8,7 g NaCl, ad 1000 ml dest. Wasser
- Tween 20 (Sigma, Best. Nr.: P-2287)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure (R36/38, S2-26).

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.

Die farblose 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 Chromogenlösung vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ($E_{450 \text{ nm}} < 0,6$) für den Nullstandard

9. Probenvorbereitung

9.1. Perirenales Rinderfett

- gefrorenes Nierenfett mit einem Skalpell abkratzen und zerkleinern
- 1g perirenales Rinderfett mit 15 ml Petrolether in einem 20 ml Extraktionsgläschen über Nacht im Wasserbad bei 40 °C unter leichtem Schütteln extrahieren
- den Extrakt zentrifugieren: 15 min/ca. 2000 g/-15 °C
(falls keine Kühlzentrifuge vorhanden ist, sollte die Probe unbedingt vor dem Zentrifugationsschritt eingefroren werden)
- den Petroletherüberstand in ein neues Gefäß dekantieren und im Wasserbad bei 60 °C evaporieren
- den Rückstand in 2 ml Methanol lösen und 20 sec. vortexen (Gefäß fest verschlossen halten)
- entfetten: 45 min bei -60 °C ausfrieren
- zentrifugieren: 5 min/ca. 2000 g/-15 °C und den Überstand in ein neues Gefäß dekantieren
- den methanolischen Überstand mit 5 ml dest. Wasser verdünnen und mittels RIDA[®] C18 column (Art. Nr.: R2002) wie folgt reinigen:

Tropfgeschwindigkeit: 1 Tropfen pro sec.

- Säule 2 x mit je 1 ml Methanol (100 %) waschen
- Säule 2 x mit je 1 ml Methanol/20 mM Tris-HCl, pH 8,5 (20/80 (v/v)) equilibrieren
- verdünnte Probe auftragen (ca. 7 ml)
- Säule 2 x mit je 1 ml Methanol/20 mM Tris-HCl, pH 8,5 (20/80 (v/v)) waschen
- Säule 2 x mit je 1 ml Methanol/dest. Wasser (40/60 (v/v)) waschen
- Restflüssigkeit aus der Säule durch Druck oder Vakuum entfernen und für 2 min Luft oder Stickstoff durchpressen bzw. durchsaugen
- Probe mit 1 ml Methanol/dest. Wasser (80/20 (v/v)) eluieren und in einem neuen Gefäß auffangen
- Flüssigkeitsreste durch Druck oder Vakuum gewinnen (Tropfgeschwindigkeit: 1 Tropfen pro sec)
- das Eluat 1 + 1 mit dest. Wasser verdünnen, um eine Methanol/dest. Wasser Lösung von 40/60 (v/v) zu erhalten
- je 20 µl pro Kavität im Test einsetzen

Anmerkung:

Abhängig von der MLGA-Konzentration in der Probe sind evtl. weitere Verdünnungen notwendig. Hierzu muss das Eluat für den Testeinsatz immer in Methanol/dest. Wasser (40/60 (v/v)) vorliegen, d. h. alle weiteren Verdünnungen mit Methanol/dest. Wasser (40/60 (v/v)) vornehmen.

9.2. Muskelfleisch

- 50 - 300 g Muskelfleischwürfel einwiegen und mit dem entsprechenden Gewichtsanteil 67 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 versetzen und mit einem Ultraturrax homogenisieren
- 8 g Muskelfleischhomogenat mit 8 ml Petrolether in einem 20 ml Extraktionsgläschen über Nacht im Wasserbad bei 40 °C unter leichtem Schütteln extrahieren

- Die weitere Vorgehensweise ist identisch zu Punkt 9.1. !

10. Testdurchführung

10.1. Testvorbereitungen

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

Das **MLGA-Enzymkonjugat** (Flasche mit rotem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da das rekonstituierte Konjugat nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Konjugat mit Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat vor Entnahme vorsichtig mischen. Um das gebrauchsfertige Konjugat herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Puffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2,0 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Die **anti-MLGA-Antikörperlösung** (Flasche mit schwarzem Verschluss) liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Lösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur soviel Antikörper-Konzentrat mit Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konzentrat vor Entnahme gut mischen. Um die gebrauchsfertige Antikörperlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:11 (1+10) mit Puffer verdünnt werden (z.B. 200 µl Konzentrat + 2,0 ml Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

Als **Waschlösung** dient dest. Wasser mit 0,05 % Tween 20 (z. B. 0,5 g Tween 20 ad 1000 ml dest. Wasser). Diese Lösung sollte für jeden Testlauf frisch hergestellt werden.

10.2. Testdurchführung

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

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 20 µl der Standardlösung bzw. der nach Abschnitt 9. vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
3. Je 50 µl verdünnte Enzymkonjugat-Lösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
4. Je 50 µl verdünnte anti-MLGA-Antikörperlösung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren, vorsichtig manuell mischen und 2 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubieren.
5. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 250 µl Waschlösung (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
6. Je 50 µl Substrat und je 50 µl Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
7. Je 100 µl Stopp-Reagenz in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe des Stopp-Reagenzes messen. Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® ELISA-Tests entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win (Art. Nr. Z9999), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

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

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 MLGA-Konzentration in [$\mu\text{g}/\text{kg}$] auftragen.

Um die in einer Probe enthaltene tatsächliche MLGA-Konzentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) zu erhalten, muss die aus der Eichkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach den angegebenen Vorschriften gelten folgende Verdünnungsfaktoren:

Perirenales Rinderfett.....	2
Muskelfleisch.....	0,5

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. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

RIDASCREEN[®] Melengestrolacetat

Brief information

RIDASCREEN[®] Melengestrolacetat (Art. No.: R6502) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of melengestrol acetate in bovine perirenal fat and muscle meat.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit. The test kit is sufficient for 48 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:	extraction over night centrifugation, evaporation, freezing, centrifugation chromatographic purification with RIDA [®] C18 columns (Art. No.: R2002)
Time requirement:	sample preparation (for 10 samples) approx. 18 h test implementation (incubation time) approx. 2 h 30 min
Detection limit:	bovine perirenal fat 0.3 ppb muscle meat 0.075 ppb
Recovery rate:	in spiked negative control bovine perirenal fat approx. 65 % muscle meat approx. 74 %
Cross-reactions:	The specificity of RIDASCREEN [®] Melengestrolacetat was established by analysing the cross-reactivity to corresponding substances. Melengestrol acetate (MLGA) 100.0 % Megestrol acetate (MGA) 10.0 % Medroxyprogesterone acetate (MPA) 6.6 % 6 α -Methyl-17 α -OH-Progesterone acetate 5.2 % Chlormadinone acetate (CMA) 4.8 % 17 α -Acetoxyprogesterone 3.9 % 16 α -Methylprogesterone 0.0035 % cross reaction of all other substances being checked in the assay \leq 0.003 %

1. Intended use

The RIDASCREEN® Melengestrolacetat test is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of melengestrol acetate in bovine perirenal fat and muscle meat. The performance of the test is adjusted to the current legal demands and well suited for the control of meat exported by the USA and Canada.

2. General

Synthetic gestagens can be used for estrus inhibition or synchronisation after break off and improvement of fertility. In addition one of these substances, melengestrol acetate (MLGA), is a licensed growth promoting feed additive for heifers in the USA and Canada. The admitted dose is 0.5 mg per day and head, given as a feed premix. Its mode of anabolic action is unclear, but it stimulates the ovarian synthesis of the endogenous anabolic steroid estradiol and that may have androgenic side effects. MLGA belongs to the most active synthetic gestagens. Its oral bioactivity is about 10 or 100 times higher than the activities of the gestagens chlormadinone acetate (CMA) or medroxyprogesterone acetate (MPA), resp. If given parenterally the hormonal activity of MLGA is still 125 times higher than the one of progesterone. Due to its strongly lipophilic properties, MLGA is accumulated in fat 200-fold higher than in blood plasma.

In the European Union the use of sexual hormones for growth promoting purposes is generally forbidden since 1988, and also the import of meat from hormone treated cattle into the EU is prohibited.

3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with capture antibodies directed against anti-MLGA antibodies. Standards or sample solution, MLGA enzyme conjugate and anti-MLGA antibodies are added. Free and enzyme conjugated MLGA compete for the antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). At the same time, the anti-MLGA antibodies are also bound by the immobilized capture antibodies. Any unbound enzyme conjugate is then removed in a washing step. Enzyme substrate (urea peroxide) and chromogen (tetramethylbenzidine) are added to the wells and incubated. Bound enzyme conjugate converts the colorless chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the melengestrol acetate concentration in the sample.

4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 48 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

- 1 x Microtiter plate with 48 wells (6 strips with 8 removable wells each)
coated with capture antibodies
- 6 x MLGA standard solutions, 1.3 ml each
0 ppb (zero standard), 0.15 ppb, 0.45 ppb, 1.35 ppb, 4.05 ppb, 12.15 ppb
MLGA in aqueous solution, ready to use
- 1 x Conjugate (0.7 ml)red cap
peroxidase conjugated MLGA
concentrate
- 1 x Anti-MLGA antibody (0.7 ml) black cap
concentrate
- 1 x Substrate (7 ml)green cap
contains urea peroxide
- 1 x Chromogen (7 ml) blue cap
contains tetramethylbenzidine
- 1 x Stop solution (14 ml)yellow cap
contains 1 N sulfuric acid
- 1 x Buffer (25 ml)
Conjugate and antibody dilution buffer

5. Materials required but not provided

5.1. Equipment:

- microtiter plate spectrophotometer (450 nm)
- freezer (-60 °C / -76 °F)
- water bath (40 °C and 60 °C / 104 °F and 140 °F)
- ultra turrax
- refrigerated centrifuge
- graduated pipettes
- variable 20 µl-, 50 µl-, 100 µl-, 200 µl- and 1000 µl-micropipettes
- RIDA® C18 columns (Art. No.: R2002)

5.2. Reagents:

- petroleum ether
- methanol
- methanol/20 mM tris-HCl (20/80 (v/v)): dissolve 2.42 g tris-(hydroxymethyl) aminomethane in approx. 700 ml distilled water + 200 ml methanol (100 %), adjust pH 8.5 with approx. 5 M HCl and fill up to 1000 ml with distilled water
- 67 mM phosphate buffer, pH 7.2: 1.79 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 9.61 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8.7 g NaCl, fill up to 1000 ml with distilled water
- Tween 20 (Sigma, Order No.: P-2287)

6. Warnings and precautions for the users

The stop solution contains 1 N sulfuric acid (R36/38, S2-26).

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 and reseal them together with the desiccant provided at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The colorless chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

- Any bluish coloration of the chromogen solution 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

9.1. Bovine perirenal fat

- grind the frozen kidney fat by scraping with a scalpel
- weigh 1 g of sample into a 20 ml vial for extraction and add 15 ml petroleum ether and shake softly in a waterbath at 40 °C (104 °F) for extraction overnight
- centrifuge the extract : 15 min/approx. 2000 g/-15 °C (5 °F)
(if a refrigerated centrifuge is not available, freeze the sample before centrifugation)
- decant the petroleum ether supernatant into a new vial and evaporate it in a 60 °C (140 °F) waterbath
- redissolve the residue in 2 ml methanol and vortex for 20 sec. (close vial tightly)
- for degreasing: freeze 45 min at -60 °C (-76 °F)
- centrifuge: 5 min/approx. 2000 g/-15 °C (5 °F) and decant the supernatant into a new vial
- dilute the methanolic supernatant with 5 ml distilled water and purify by RIDA[®] C18 columns (Art. No.: R2002) as follows:

flow rate: 1 drop per sec

- rinse column twice with 1 ml methanol (100 %)
- equilibrate column twice with 1 ml methanol/20 mM tris-HCl, pH 8.5 (20/80 (v/v))
- apply diluted sample (approx. 7 ml)
- rinse the column twice with 1 ml methanol/20 mM tris-HCl, pH 8.5 (20/80 (v/v))
- rinse the column twice with 1 ml methanol/ distilled water (40/60 (v/v))
- remove fluid residues by positive pressure or vacuum and dry column for 2 min by floating it with air or nitrogen
- elute sample with 1 ml methanol/distilled water (80/20 (v/v)) into a new vial
- collect residues by applying positive pressure or vacuum (flow rate: 1 drop/sec)
- dilute the eluate 1 + 1 with distilled water to get a methanol/distilled water solution of 40/60 (v/v)
- employ 20 µl per well in the assay

remark:

Depending on the MLGA concentration in the sample further dilutions may be necessary. In this case use methanol/distilled water (40/60 (v/v)) for all further dilutions (i. e. always maintain 40 % methanol).

9.2. muscle meat

- cut 50 - 300 g of muscle meat into cubes and add the corresponding volume of 67 mM of phosphate buffer, pH 7.2 and homogenize with an ultra turrax
- weigh 8 g of sample into a 20 ml vial and add 8 ml petroleum ether for extraction and shake softly in a waterbath at 40 °C (104 °F) for extraction overnight
- The following sample preparation steps are identical to 9.1. !

10. Test implementation

10.1. Preliminary comments

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

The **MLGA enzyme conjugate** (bottle with red cap) is provided as a concentrate. Since the diluted enzyme conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the enzyme conjugate should be shaken carefully. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in buffer (e. g. 200 µl conjugate concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

The **anti-MLGA antibody solution** (bottle with black cap) is provided as a concentrate. Since the diluted antibody solution has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before pipetting, the antibody concentrate should be shaken thoroughly. For reconstitution, the conjugate concentrate is diluted 1:11 (1+10) in buffer (e. g. 200 µl antibody concentrate + 2 ml buffer, ready to use sufficient for 4 microtiter strips).

For the **wash solution** use distilled water with 0.05 % tween 20 (e. g. 0.5 g tween 20 in 1000 ml of distilled water). This solution must be freshly prepared for each test series.

10.2. Test procedure

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

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 20 µl of each standard solution or prepared sample to separate duplicate wells.
3. Add 50 µl of diluted enzyme conjugate to each well.
4. Add 50 µl of the diluted anti-MLGA antibody solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate 2 h 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 (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all wells with 250 µl of wash solution (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
6. Add 50 µl of substrate and 50 µl of chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
7. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by rocking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm against an air blank. Read within 30 minutes after addition of stop solution.

11. Results

A special software, the RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9999), is available to evaluate the RIDASCREEN[®] ELISA assays.

The course of the standard curve is shown in the joined Quality Assurance Certificate.

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 MLGA concentration in [$\mu\text{g}/\text{kg}$].

In order to obtain the MLGA concentration in $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) 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 factors are as follows:

bovine perirenal fat.....	2
muscle meat.....	0.5

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. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. 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.