

*Read instructions carefully before starting test*

# Veratox<sup>®</sup> for Gliadin

*Refrigerate at 2–8°C (35–46°F) • Do not freeze*

## **GLIADIN/GLUTEN**

Gliadin is an alcohol-soluble protein found in wheat that belongs to a group of proteins called prolamins. Other prolamins include secalin, found in rye, and hordein, found in barley. Gluten consists of two groups of proteins (prolamins and glutelins) that are found in differing amounts in wheat, barley, rye and oats.

Gliadin and other prolamins have been identified as major causal agents in a number of disorders, including wheat allergy and gluten intolerance (celiac disease). Wheat allergy is a specific immune response to a number of wheat proteins, including gliadin, albumin, globulin, and glutenin. Celiac disease is a chronic reaction to gluten proteins that results in the poor absorption of nutrients in the small intestine.

Those with celiac disease must avoid gluten, and rely upon the correct labeling of food to make appropriate, safe food choices. Testing for the presence of gluten components ensures food manufacturers that an unlabeled—and potentially dangerous—ingredient did not make its way into a food product.

## **INTENDED USE**

Veratox<sup>®</sup> for Gliadin is intended for the quantitative analysis of ingredients, clean-in-place solutions, and finished food products intended to be gluten-free for the presence of gliadins and prolamins found in wheat, barley and rye.

## **INTENDED USER**

This test kit is designed for use by quality control personnel and others familiar with foods possibly contaminated by gluten. Since technique is very important, operators should be trained by a Neogen representative or someone who has completed the Neogen training.

## **ASSAY PRINCIPLES**

Veratox for Gliadin is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Gliadin is extracted from samples with a 40% ethanol solution by shaking in a shaker or rotator. Extract is diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS) and diluted samples are added to antibody-coated wells (capture antibody) where gliadin will bind to the antibody during an incubation period. Any unbound gliadin is washed away and a second antibody, which is enzyme labeled (detector antibody) is added. The detector antibody binds to the gliadin during another incubation period. Unbound enzyme-labeled antibody is washed away and a one step substrate is added. Color develops as a result of the presence

of bound-labeled antibody. A stopping reagent is added and the color of the solution is observed. Blue color indicates samples containing high levels of gliadin while purple or red samples contain little or no gliadin. The optical densities of the controls form a standard curve, and the sample optical densities are plotted against the curve to calculate the exact concentration of gliadin in parts per million (ppm).

### STORAGE REQUIREMENTS

The kit can be used until the expiration date on the label when stored refrigerated at 2–8°C (35–46°F).

### MATERIALS PROVIDED

1. 48 antibody-coated microwells
2. 48 red-marked transfer wells
3. 5 yellow-labeled bottles of 0, 5, 10, 20, and 50 ppm gliadin controls (0, 12.5, 25, 50 and 125 ng/mL gliadin)
4. 2 blue-labeled bottles of enzyme-labeled antibody conjugate
5. 1 green-labeled bottle of K-Blue® Substrate
6. 1 red-labeled bottle of Red Stop solution
7. 40 mL of 10 mM PBS-Tween washing reagent in a wide mouth bottle. Each bottle can prepare 1 L in distilled or deionized water (pH 7.4)
8. 1 foil pouch of 10 mM PBS dry powder containing enough powder to prepare 1 L of dilution solvent
9. 50 g of extraction additive in 2 specimen cups
10. Plastic scoop to measure extraction additive

### MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

1. Orbital rotator or shaker to hold 50 cc centrifuge tubes for a 1 g sample, or shaker water bath with clamps adjusted to hold 125 mL (4 oz) extraction bottles for a 2 g sample
2. Oven or water bath adjustable to 50°C if analyzing heat-processed samples
3. Scale capable of weighing  $1 \pm 0.1$  g (Neogen item 9427), or scale capable of weighing  $0.25 \pm 0.01$  g if using gliadin cocktail solution (Neogen item 9395)
4. Pipettor, 50–200 µL adjustable (Neogen item 9276)
5. Pipettor, 12-channel (Neogen item 9273)
6. Pipette tips (Neogen item 9410, 9417, 9407)
7. Three 1 L bottles to prepare washing solution, extract solution, and sample extract dilution solution (Neogen item 9472)
8. Test tubes to perform sample extract dilution
9. Timer (Neogen item 8426, 9452)
10. Microwell reader with a 650 nm filter (Neogen item 9303)
11. Three reagent boats for 12-channel pipettor (Neogen item 9435)
12. Microwell strip holder (Neogen item 9402)
13. Wash bottle (Neogen item 9400)
14. Paper towels or equivalent absorbent material
15. Waterproof marker
16. Distilled or deionized water
17. Laboratory grade ethanol (190 proof)
18. Special extraction additive for dark chocolate, cocoa and tannin (Neogen item 8482)
19. Cocktail solution for analysis of heat-processed samples (Neogen item 8483)

### PRECAUTIONS

1. Ethanol solution is highly flammable. Keep container tightly closed, and keep away from heat, sparks, open flame and those smoking. It is toxic if swallowed, or if vapor is inhaled. Avoid contact with skin.
2. Use chemical hood when using cocktail solution to analyze heat-processed samples.
3. Components of Veratox for Gliadin, such as controls and extraction additive, may contain one or more of the following potentially allergic materials: gluten, casein, almond protein and soy protein. If allergic to any of these compounds, use caution when using this product.
4. Store test kit between 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze test kits, and avoid prolonged storage at ambient temperatures.

5. Bring kits to room temperature (18–30°C, 64–86°F) prior to use.
6. Do not use kit components beyond expiration date.
7. Do not mix reagents from one kit with reagents from a kit with a different serial number.
8. Do not run more than 24 wells per test.
9. Follow proper pipetting techniques (e.g., prime tips and use clean tips).
10. Use only incubation times specified; others may give inaccurate results.
11. Use clean pipette tips and glassware for each sample to avoid cross-contamination. Thoroughly wash all glassware between samples.

## PROCEDURAL NOTES

1. **Dark chocolate, cocoa and tannin.** If testing commodities where dark chocolate, cocoa, and/or tannin are present, such as dark chocolate bars and cocoa powder, contact Neogen for a special extraction additive (Neogen item 8482). Add 1 scoop of this special extraction additive in addition to 1 scoop of the additive supplied with this test kit.
2. **Substrate.** K-Blue Substrate is ready for use. The substrate should be clear to light blue — discard if it has turned dark blue. Only pour the needed volume of substrate into a reagent boat. **Do not return unused substrate to the bottle.** Cover the reagent boat to keep the substrate protected from light until needed.
3. **Sample extract dilution solution (PBS).** Prepare extract dilution solution by adding a foil pouch of dilution solvent, 10 mM PBS, to 1 L distilled or deionized water. Swirl to mix thoroughly.
4. **Wash buffer.** Prepare the wash buffer solution by diluting the wash buffer concentrate in 960 mL of distilled or deionized water in an empty 1 L container. Ensure the transfer of all concentrate by rinsing the bottle several times with water, and swirl to assure thorough mixing.  
**NOTE:** Discard unused portions of extraction solution and wash buffer when the test kit has been used completely.
5. **Antibody wells.** Keep wells sealed in the foil pouch until needed. Remove wells from the foil pouch only after samples are extracted, and the test procedure is set to begin.

## SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION

For analyzing **heat-processed** samples, follow extraction **procedure C**. For all commodities that were **not heat-processed**, follow either extraction procedure **A or B**. Samples of an unknown origin should be extracted using extraction procedure C.

### A. Extraction of non-heat processed samples with orbital shaker or rotator

1. Prepare 40% ethanol extraction solution by combining 4 parts ethanol with 6 parts distilled water. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note 3.
2. Add 1 g ground sample, or 1 mL liquid sample, to a clean 50 cc tube.
3. Add 1 scoop of extraction additive to the tube (see procedural note 1).
4. Add 10 mL (9 mL for liquid samples) of 40% ethanol to the tube, cap tightly, then shake the tube vigorously by hand for about **20 seconds**, or vortex for **10 seconds**, to ensure complete mixing.
5. Extract by shaking (150 rpm) in an orbital shaker or rotator by laying down the tube on its side over the flat pad of the instrument, and holding it tightly using a rubber band or tape. Rotate or shake for **15 minutes** at room temperature.
6. Remove the tube and let it stand in a rack for about **10 minutes** to enable the sample extract to settle before withdrawing the clear extract.
7. Dilute each sample 1:40 by withdrawing 100 µL of the upper layer of the extract and transferring it to a small tube or vial containing 3.9 mL of PBS, or mix 0.5 mL of extract with 19.5 mL of PBS in a test tube.
8. To mix, vortex the tube for **5 seconds**, or invert several times by hand.
9. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

**B. Extraction of non-heat processed samples with shaker or shaker water bath**

1. Prepare 40% ethanol extraction solution by combining 4 parts ethanol with 6 parts distilled water. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note #3.
2. Add 2 g ground sample, or 2 mL liquid sample, to a 125 mL clean extraction bottle.
3. Add 1 scoop of extraction additive to the bottle (see procedural note 1).
4. Add 20 mL (18 mL for liquid samples) of 40% ethanol, cap the bottle tightly, then shake vigorously by hand for about **20 seconds** to ensure complete mixing.
5. Extract by shaking (150 rpm) in a shaker for **15 minutes** at room temperature (a shaker water bath can work, but do not turn the heat on). Remove the bottle from shaker or bath.
6. Let the bottle stand for about **10 minutes** to enable some of the sample to settle before withdrawing the clear extract.
7. Dilute each sample 1:40 by withdrawing 100 µL of the upper layer of the extract and transferring it to a small tube or vial containing 3.9 mL of PBS, or mix 0.5 mL of extract with 19.5 mL of PBS.
8. To mix, vortex the tube for **5 seconds**, or invert several times by hand.
9. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

**C. Extraction of heat processed commodities**

Heat-processed commodities require an extraction cocktail solution (Neogen item 8483) that re-natures the heated gliadin and allows the accurate detection of any possible gliadin in a sample. To extract gliadin from heat-processed samples:

1. Prepare 55% ethanol extraction solution by combining 55 parts ethanol with 45 parts distilled water.
2. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note 3.  
**NOTE:** Extraction with extraction cocktail solution should be performed under a chemical hood.
3. Weigh out 0.25 g sample to 50 cc screw cap centrifuge tube.
4. Add 2.5 mL of extraction cocktail solution (dilution factor 1:10).
5. Cap and vortex **10–20 seconds** to homogenize cocktail and sample.
6. Incubate **40 minutes** at 50°C (water bath or oven).
7. Remove samples and let cool for **5–10 minutes**.
8. Add 1 scoop of special extraction additive (see procedural note 1).
9. Add 7.5 mL of 55% ethanol and vortex again for **10–20 seconds** (the final concentration of ethanol will be 41% and the sample dilution to this point is 1:40).
10. Shake (150–200 rpm) for **1 hour** at room temperature on a rotator (tube on its side).
11. Centrifuge sample (if necessary) for **5 minutes** at 2500 rpm.
12. Dilute the sample 1:10 into PBS (200 µL sample into 1.8 mL PBS).
13. Samples are ready to run (1:400 final dilution).

**TEST PROCEDURE**

Allow the test kit and all reagents to warm to room temperature (18–30°C, 64–86°F) before using.

1. Remove 1 red-marked mixing well for each sample to be tested plus 5 red-marked wells for controls, and place in the well holder.
2. Remove an equal number of antibody-coated wells. Return antibody wells which will not be used immediately to the foil pack with desiccant. Reseal the foil pack to protect the antibody. Mark one end of the strip with a "1", and place strip in the well holder with the marked end on the left.
3. Mix each reagent by swirling the reagent bottle prior to use.
4. Using a new pipette tip for each, transfer 150 µL of controls and sample extracts to the red-marked transfer wells as shown in the template below. Only run up to two 12-well strips at a time.

0	5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19

- Place tips on the 12-channel pipettor and transfer 100  $\mu$ L of the controls and sample extracts to the antibody-coated wells. Mix for **20 seconds** by sliding the well holder back and forth on a flat surface.
- Incubate microwells **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F). Discard the red-marked transfer wells.
- Empty the contents of the wells into a sink. With a wash bottle fill each antibody well with the wash buffer solution and dump out. Repeat the washing 5 times, then turn the wells upside down and tap out on a paper towel until all washing solution is removed.
- Pour the needed volume of conjugate from the blue-labeled bottle into a clean reagent boat.
- Using the 12-channel pipettor and new tips, transfer 100  $\mu$ L of the conjugate into all the wells and mix for **20 seconds** by sliding the well holder back and forth on a flat surface.
- Incubate for **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
- Wash all wells with the wash buffer solution as described in step 7.
- Pour the needed volume of substrate solution from the green-labeled bottle into a clean reagent boat.
- Place new tips on the 12-channel pipettor and transfer 100  $\mu$ L of substrate into each well and mix for **20 seconds**. Do not eject tips.
- Incubate for **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
- Pour the needed volume of Red Stop solution from the red-labeled bottle into a clean reagent boat.
- With the same tips used to dispense the substrate, transfer 100  $\mu$ L of Red Stop into each well and mix for **20 seconds**.
- Wipe the bottom of the microwells and read in a microwell reader with a 650 nm filter.
- Interpret the test's results using the Neogen 4700 microwell reader, or an equivalent strip reader. If using a strip reader, calculate the results using Neogen's Veratox software for Windows.

### INTERPRETATION OF RESULTS

Standard controls were made from wheat gliadin and calculated as gliadin. Approximately 50% of the gluten is available as gliadin. Therefore, to calculate the gluten value of the samples, multiply the ppm gliadin results by 2.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Limit of quantitation:** 5 ppm (Described as the lowest concentration point on the calibration curve that this test can reliably detect gliadin.)

**Range of quantitation:** 5–50 ppm (For quantitating samples above 50 ppm, contact a Neogen representative for dilution instructions).

### CUSTOMER SERVICE

Neogen Customer Assistance and Technical Services can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

### SDS INFORMATION AVAILABLE

Safety data sheets (SDS) are available for this test kit, and all of Neogen's test kits, on Neogen's website at [foodsafety.neogen.com](http://foodsafety.neogen.com), or by calling Neogen at 800.234.5333 or 517.372.9200.

### TERMS AND CONDITIONS

For Neogen's full terms and conditions, please visit [www.neogen.com/en/terms-and-conditions](http://www.neogen.com/en/terms-and-conditions).

### WARRANTY

Neogen Corporation 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, Neogen will provide a replacement of the product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product. There is no warranty of merchantability of this product or of the fitness of the product for any purpose. Neogen shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

## TESTING KITS AVAILABLE FROM NEOGEN

### Natural toxins

- Aflatoxin, DON, ochratoxin, zearalenone, T-2/HT-2 toxins, fumonisin, histamine

### Foodborne bacteria

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*

### Sanitation

- ATP, yeast and mold, total plate count, generic *E. coli* and total coliforms, protein residues

### Food allergens

- Almonds, coconut, crustaceans, eggs, gliadin, hazelnut, milk, multi-treenut, mustard, peanuts, sesame, soy, walnuts

### Genetic modification

- CP4 (Roundup Ready®)

### Ruminant by-products

- Meat and bone meal, feed

### Species identification

- Raw and cooked meat samples



### North America

#### Neogen Headquarters

800/234-5333 (USA/Canada)  
foodsafety@neogen.com  
foodsafety.neogen.com/en

### Europe, Middle East and Africa

#### Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600  
info\_uk@neogeneurope.com  
foodsafety.neogen.com/uk

### Mexico

#### Neogen Latinoamerica

+52 (55) 5254-8235  
informacion@neogenlac.com  
foodsafety.neogen.com/sp

### Brazil

#### Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727  
info@neogendobrasil.com.br  
foodsafety.neogen.com/pt

### China

#### Neogen Bio-Scientific Technology

+86 21 6271 7013  
info@neogenchina.com.cn  
www.neogenchina.com.cn

### India

#### Neogen Food and Animal Security

**+91 484 2306598, 2301582**  
info@neogenindia.com  
www.neogenindia.com

*Por favor lea las instrucciones cuidadosamente antes de realizar la prueba*

# Veratox® para Gliadina

*Refrigere a 2–8°C (35–46°F) • No congele*

## **GLIADINA/GLUTEN**

La gliadina es una proteína soluble en alcohol que se encuentra en el trigo y pertenece a un grupo de proteínas llamadas prolaminas. Otras prolaminas incluyen la secalina, que se encuentra en el centeno, y la hordeína, que se encuentra en la cebada. El gluten consiste de dos grupos de proteínas (prolaminas y glutelinas) las cuales se encuentran en diferentes cantidades en el trigo, la cebada, el centeno y la avena.

La gliadina y otras prolaminas fueron identificadas como los principales agentes causantes de una multitud de enfermedades, incluyendo la alergia al trigo y la intolerancia al gluten (celiaquía). La alergia al trigo consiste de una respuesta inmunitaria específica a un gran número de proteínas del trigo, incluyendo la gliadina, albúmina, globulina y glutenina. La celiaquía es una reacción crónica a las proteínas del gluten que resulta en una deficiencia en la absorción de nutrientes en el intestino delgado.

Aquellos individuos que deben evitar la ingestión de gluten basan sus decisiones nutricionales en el etiquetado de alimentos para tomar decisiones seguras e informativas para su alimentación. La realización de las pruebas para determinar la presencia de componentes del gluten le garantiza a los fabricantes de alimentos que no se infiltró ningún ingrediente que no aparezca en la etiqueta (y que sea potencialmente peligroso).

## **PROPÓSITO DE USO**

Veratox® para Gliadina está indicado para el análisis cuantitativo de ingredientes, soluciones de limpieza de elementos sin desmontarlos, productos alimentarios terminados y superficies ambientales identificadas como libres de gluten para detectar la presencia de gliadina y prolaminas halladas en el trigo, la cebada y el centeno.

## **USUARIOS PREVISTOS**

El kit de Veratox para Gliadina está diseñado para ser utilizado por el personal de control de calidad y otras personas familiarizadas con productos que estén posiblemente contaminados con gluten. Debido a la importancia de la técnica los operadores deben ser entrenados por un representante de Neogen o por alguien que haya completado el entrenamiento de Neogen.

## **FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS**

Veratox para Gliadina es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (S-ELISA). La gliadina es extraída de la muestra con una solución de etanol al 60 % agitándolo en un agitador o rotador. El extracto se diluye con la solución de tampón fosfato salino (PBS) y las muestras diluidas se agregan

a los micropocillos cubiertos con un anticuerpo antígeno donde la gliadina se fijará al anticuerpo formando un inmunocomplejo durante un período de incubación. El primer lavado eliminara toda la gliadina que esté presente en exceso y se agrega un segundo anticuerpo marcado con una enzima (anticuerpo detector). El anticuerpo detector se fija a la gliadina formando un inmunocomplejo durante un período de incubación. El segundo lavado elimina el exceso de anticuerpo detector y se agrega un sustrato enzimático. El color se desarrolla como resultado de la presencia de inmunocomplejos. Se agrega un reactivo que detiene la reacción y se observa el color de la solución. El color azul indica que las muestras contienen niveles altos de gliadina, mientras que las muestras violetas o rojas contienen poca o nada de gliadina. Las densidades ópticas de los controles, forman una curva estándar, y las densidades ópticas de la muestra se trazan contra la curva para calcular la concentración exacta de gliadina en partes por millón (ppm).

### **ALMACENAMIENTO**

Este kit puede utilizarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta, si se mantiene almacenado en la nevera entre 2-8°C (35-46°F).

### **MATERIALES INCLUIDOS**

1. 48 micropocillos cubiertos con anticuerpos
2. 48 micropocillos de transferencia marcados en rojo
3. 5 botellas con etiquetas amarillas conteniendo controles de gliadina de 0, 5, 10, 20 y 50 ppm (0, 12.5, 25, 50 y 125 de ng/mL de gliadina)
4. 2 botellas con etiqueta azul conteniendo el conjugado del anticuerpo marcado con la enzima
5. 1 botella con etiqueta verde de sustrato K-Blue<sup>®</sup>
6. 1 botella con etiqueta roja de solución "Red Stop"
7. 40 mL en una botella de boca ancha con el concentrado del tampón para lavado de Tampón Fosfato Salino-Tween 10 mM para preparar 1 L en agua destilada o desionizada (pH 7.4))
8. 1 bolsa de aluminio con polvo seco de tampón fosfato salino 10 mM suficiente para preparar 1 L de solvente de dilución
9. 50 g de aditivo de extracción en 2 envases para especímenes
10. Cuchara de plástico dosificadora para medir el aditivo de extracción

### **MATERIALES RECOMENDADOS (NO VIENEN INCLUIDOS)**

1. Agitador o rotador orbital que soporte tubos de centrifuga de 50 cm<sup>3</sup> para una muestra de 1 g, o agitador o baño de maría con prensas de sujeción para sostener la botella de extracción de 125 mL (4 onzas) para una muestra de 2 g
2. Horno o baño de maría ajustable a 50°C para el análisis de muestras con tratamiento térmico
3. Balanza apta para pesar 1± 0.1 g (Producto Neogen 9427) o balanza apta para pesar 0.25 ± 0.01 g si se usa el cóctel (solución) de gliadina (Producto Neogen 9395)
4. Pipeta, 50–200 µL ajustable (Producto Neogen 9276)
5. Pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9273)
6. Puntas de pipeta (Producto Neogen 9410, 9417, 9407)
7. 3 botellas de 1L para preparar la solución de lavado, la solución de extracción y la la solución de dilución del extracto (Producto Neogen 9472)
8. Tubos de ensayo para diluir el extracto
9. Cronómetro (Producto Neogen 8426, 9452)
10. Lector de micropocillos con un filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
11. 3 botes de reactivos para usar con una pipeta de 12 canales (Producto Neogen 9435)
12. Lector de micropocillos con un filtro de 650 nm (Producto Neogen 9303)
13. Piseta (Producto Neogen 9400)
14. Toallas de papel o un material absorbente equivalente
15. Marcador resistente al agua
16. Agua destilada o desionizada
17. Etanol de calidad de laboratorio 95%
18. Aditivo especial de extracción para chocolate negro, cacao y taninos (Producto Neogen 8482)
19. Cóctel (solución) de renaturalización de gliadina para el análisis de muestras con tratamiento térmico (Producto Neogen 8483)



## PRECAUCIONES

1. La solución de etanol es muy inflamable. Siempre asegúrese de cerrar el envase y manténgalo alejado del calor, chispas, llamas expuestas y fumadores. Este producto es tóxico si es ingerido o inhalado. Evite el contacto con la piel.
2. Utilice la campana de extracción de gases químicos cuando use el cóctel (solución) para el análisis de muestras con tratamiento térmico.
3. Los componentes de Veratox para Gliadina R5, como los controles y el aditivo de extracción, pueden contener uno o más de los siguientes materiales con el potencial de ser alérgicos: gluten, caseína, proteína de almendras y proteína de soja. Si es alérgico a cualquiera de estos complejos, sea precavido en el uso de este producto.
4. Guarde el kit de prueba entre (2-8°C (35-46°F)) cuando no se utilice. No congele los kits de prueba y evite el almacenamiento prolongado a temperatura ambiental.
5. Permita que los kits se entibien a temperatura ambiental (18-30°C (64-86°F)) antes de utilizarlos.
6. No utilice componentes del kit que estén vencidos.
7. No mezcle reactivos de un kit con los reactivos de otro kit con un número de serie diferente.
8. No trabaje con más de 24 micropocillos por prueba.
9. Utilice buenas técnicas de pipeteo (por ejemplo, el ajuste de las puntas y siempre use puntas de pipeta limpias).
10. El uso de periodos de incubación distintos a los especificados puede dar lugar a resultados erróneos.
11. Utilice puntas de pipeta y piezas de vidrio limpias con cada muestra para evitar contaminación cruzada. Lave todas las piezas de vidrio entre cada una de las muestras.

## NOTAS CON RESPECTO AL PROCEDIMIENTO

1. **Chocolate negro, cacao y taninos.** Para el análisis de productos que contienen chocolate negro, cacao, y/o tanino, como barras de chocolate negro y polvo de cacao, contacte a Neogen para un aditivo de extracción especial (Producto Neogen 8482). Agregue 1 cucharada de este aditivo de extracción en adición al aditivo incluido en el kit.
2. **Sustrato.** El sustrato K-Blue está listo para uso. El sustrato debe ser transparente o azul claro – deseche si el líquido ha cambiado a azul oscuro. Agregue solo el volumen necesario al bote de reactivos. **No vuelva a embotellar sustrato que no fue usado.** Cubra el bote de reactivos para mantener el sustrato protegido de la luz hasta que lo necesite.
3. **Solución diluyente del extracto de la muestra (Tampón Fosfato Salino).** Para preparar la solución diluyente del extracto, agregue una bolsa de aluminio de solvente de dilución, Tampón Fosfato Salino 10 mM, a 1 L de agua destilada o desionizada. Agite para mezclar bien.
4. **Tampón para el lavado.** Para preparar la solución de tampón para el lavado, vierta el concentrado de tampón para lavado en un recipiente de 1 L. Agregue 960 mL de agua destilada o desionizada. Agite por rotación para garantizar que se mezcle bien.  
**NOTA:** Deseche las partes que no se usaron de la solución de extracción y el tampón para el lavado cuando el kit de prueba se haya usado completamente.
5. **Micropocillos con anticuerpos.** Mantenga los micropocillos sellados en la bolsa de aluminio hasta que los necesite. Retire los micropocillos de la bolsa de aluminio después de extraer las muestras y cuando esté listo para iniciar el procedimiento de la prueba.

## PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Para analizar **muestras con tratamiento térmico**, siga el **procedimiento** de extracción **C**. Para todos los productos que **no recibieron tratamiento térmico**, siga el procedimiento de extracción **A o B**. Las muestras de origen desconocido se deben ser extraídos con el procedimiento de extracción **C**.

### A. Extracción de muestras sin tratamiento térmico con un agitador o rotador orbital

1. Prepare la solución de extracción de etanol al 40%, combine 4 partes de etanol con 6 partes de agua destilada. Prepare la solución diluyente del extracto de la muestra (Tampón Fosfato Salino) como se describe en las notas con respecto al procedimiento n.º3.
2. Agregue 1 g de muestra pulverizada o 1 mL de muestra líquida a un tubo limpio de 50 cm<sup>3</sup>.
3. Agregue 1 cucharada del aditivo de extracción al tubo (notas con respecto al procedimiento n.º1).
4. Agregue 10 mL (9 mL para muestras líquidas) de etanol al 40% al tubo, tápelo firmemente, agite el tubo vigorosamente a mano por **20 segundos**, o en un agitador por **10 segundos**, para garantizar una mezcla completa.

5. Extraiga agitando a (150 rpm) en un agitador durante o rotador orbital poniendo el tubo de lado en la almohadilla del instrumento y sosteniéndolo firmemente con un caucho o cinta. Rote o agite por **15 minutos** a temperatura ambiental. Retire la botella del agitador o del baño.
6. Retire el tubo y déjelo descansar en un estante por **10 minutos** para que la muestra pueda estabilizarse antes de retirar el extracto transparente.
7. Diluya cada muestra en una proporción de 1:40; Extraiga 100 µL de la porción superior del extracto y transfírela a un tubo o ampollita que contenga 3.9 mL de Tampón Fosfato Salino, o mezcle 0.5 mL del extracto con 19.5 mL de Tampón Fosfato Salino en un tubo de ensayo.
8. Para mezclar agite el tubo con un agitador por **5 segundos**, o invierta varias veces a mano.
9. Analice las muestras diluidas dentro de **2-3 horas** después de la extracción.

#### **B. Extracción de muestras sin tratamiento térmico con un agitador o un baño maría con agitación**

1. Prepare la solución de extracción de etanol al 40%, combine 4 partes de etanol con 6 partes de agua destilada. Prepare la solución diluyente del extracto de la muestra (Tampón Fosfato Salino) como se describe en las notas con respecto al procedimiento n.º3.
2. Agregue 2 g de muestra pulverizada o 2 mL de muestra líquida a una botella de extracción limpia de 125 mL.
3. Agregue 1 cucharada del aditivo de extracción a la botella (notas con respecto al procedimiento n.º1).
4. Agregue 20 mL (18 mL para muestras líquidas) de etanol al 40%, tape bien la botella y luego agite vigorosamente a mano por **20 segundos** para garantizar una mezcla completa.
5. Extraiga agitando (150 rpm) en un agitador durante **15 minutos** a temperatura ambiental (un baño maría con agitación puede funcionar, pero no eleve la temperatura). Retire la botella del agitador o del baño.
6. Retire el tubo y déjelo descansar en un estante por **10 minutos** para que la muestra pueda estabilizarse antes de retirar el extracto transparente.
7. Diluya cada muestra en una proporción de 1:40; Extraiga 100 µL de la porción superior del extracto y transfírela a un tubo o ampollita que contenga 3.9 mL de Tampón Fosfato Salino, o mezcle 0.5 mL del extracto con 19.5 mL de Tampón Fosfato Salino en un tubo de ensayo.
8. Para mezclar agite el tubo con un agitador por **5 segundos**, o invierta varias veces a mano.
9. Analice las muestras diluidas dentro de **2-3 horas** después de la extracción.

#### **C. Extracción de productos con tratamiento térmico**

Los productos con tratamiento térmico requieren un cóctel de renaturalización (solución) de la gliadina (Producto Neogen 8483) esto renaturaliza la muestra con tratamiento térmico y permite la determinación apropiada de gliadina en la muestra. Para extraer gliadina de muestras con tratamiento térmico:

1. Prepare la solución de extracción de etanol al 55% combine 55 partes de etanol con 45 partes de agua destilada.
2. Prepare la solución diluyente del extracto de la muestra (Tampón Fosfato Salino) como se describe en las notas con respecto al procedimiento n.º3.  
**NOTA:** Es recomendado utilizar la campana de extracción de gases químicos cuando esté realizando la prueba usando el cóctel (solución) para el análisis de muestras con tratamiento térmico.
3. Pese 0.25 g de muestra y colóquela en un tubo de centrifuga de de 50 cm<sup>3</sup> con tapa.
4. Agregue 2.5 mL del cóctel de renaturalización (proporción de dilución 1:10).
5. Tape y agite en un agitador por **10-20 segundos** para homogeneizar la muestra.
6. Incube por **40 minutos** a 50°C (horno o baño de maría).
7. Retire las muestras y déjelas enfriar de **5-10 minutos**.
8. Agregue 1 cucharada de aditivo (nota de procedimiento n.º1).
9. Agregue 7.5 mL de etanol al 55% y agite con el agitador de **10-20 segundos** (la concentración final del etanol será 41% y la proporción de dilución de la muestra 1:40).
10. Agite (150 a 200 rpm) por **1 hora** a temperatura ambiental en un rotador (tubo acostado).
11. Centrifugue la muestra (si es necesario) por **5 minutos** a 2,500 rpm.
12. Diluya la muestra en una proporción de 1:10 en Tampón Fosfato Salino 10 mM, pH 7.4 (200 µL de la muestra en 1.8 mL de Tampón Fosfato Salino).
13. Las muestras están listas para analizar (proporción de dilución final 1:400).

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Deje que el kit de prueba y todos los reactivos se entibien a temperatura ambiental (entre 18-30°C (64-86°F)) antes de utilizarlos.

1. Separe 1 micropocillo por cada muestra que valla ser analizada, además de 1 micropocillo marcado en rojo para los controles, y colóquelos en el estante para micropocillos
2. Retire el mismo número de micropocillos cubiertos con anticuerpos. Retorne los micropocillos que no se van a usar a la bolsa de aluminio con el paquete desecante inmediatamente. Selle la bolsa de aluminio para proteger los anticuerpos. Marque un extremo de la tira con un "1", y ponga la tira en el estante para micropocillos con el extremo que está marcado hacia el lado izquierdo.
3. Mezcle cada reactivo agitando cada botella antes de uso.
4. Usando una punta de pipeta nueva para cada uno de los micropocillos, transfiera 150 µL de los controles y extractos de muestra a los micropocillos de transferencia marcados en rojo según se indica en la plantilla a continuación. Solo trabaje con 12 tiras de micropocillos a la vez.

0	5	10	20	50	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19

5. Coloque puntas nuevas en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µL de los controles y de extractos de muestras a los micropocillos recubiertos con anticuerpos. Mezcle durante **20 segundos** deslizando la gradilla para micropocillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie plana.
6. Incube los micropocillos por **10 minutos** a temperatura ambiental (entre 18-30°C (64-86°F)). Deseche los micropocillos de transferencia marcados en rojo.
7. Agite los micropocillos para expulsar su contenido. Con una piseta llena de tampón para el lavado, llene cada micropocillo y agite para expulsar su contenido. Repita este paso 5 veces. Elimine el exceso de tampón para lavado invirtiendo los micropocillos y golpeándolos vigorosamente sobre una toalla absorbente.
8. Agregue el volumen requerido del conjugado de la botella marcada con una etiqueta azul a un bote de reactivos limpio.
9. Usando la pipeta de 12 canales y puntas nuevas transfiera 100 µL del conjugado a todos los micropocillos y mezcle durante **20 segundos** deslizando el estante para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.
10. Incube los micropocillos por **10 minutos** a temperatura ambiental (entre 18-30°C (64-86°F)).
11. Lave todos los micropocillos con el tampón para lavado, tal y como esta descrito en el paso n.º7.
12. Agregue el volumen requerido de la solución en la botella marcada con una etiqueta verde a un bote de reactivos limpio.
13. Coloque puntas nuevas en el pipeteador de 12 canales y transfiera 100 µL del sustrato en cada micropocillo y mezcle durante **20 segundos**. No expulse las puntas.
14. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiental (entre 18-30°C (64-86°F))
15. Agregue el volumen requerido de la solución Red Stop en la botella marcada con una etiqueta roja a un bote de reactivos limpio.
16. Con las mismas puntas que fueron usadas para dispensar el sustrato, transfiera 100 µL de Red Stop a todos los micropocillos y mezcle por **20 segundos**.
17. Pase un paño por la superficie inferior y lea el lector de micropocillos con un filtro de 650 nm.
18. Interprete los resultados de la prueba utilizando el lector de micropocillos 4700 de Neogen, o un lector de tiras equivalente. Si usa un lector de tiras, calcule los resultados utilizando el software para Windows de Veratox de Neogen.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los controles estándar fueron hechos de gliadina de trigo y calculados como gliadina.

Aproximadamente 50% del gluten es disponible como gliadina. Por lo tanto, para calcular el valor de gluten en las muestras, multiplique el ppm de los resultados de gliadina por 2.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

**Límite de cuantificación:** 5 ppm (Descrito como el punto de concentración más bajo en la curva de calibración para la detección de gliadina de manera fiable).

**Rango de cuantificación:** 5–50 ppm (Para cuantificar muestras de más de 50 ppm, contacte a un representante de Neogen para instrucciones en como diluir).

## SERVICIO DE ATENCIÓN AL CLIENTE

La información para contactar el servicio de atención al cliente y soporte técnico está en la parte de atrás de este folleto. Hay disponibilidad de entrenamiento para este producto y todos los kits de Neogen

## INFORMACIÓN DE HOJAS DE SEGURIDAD (SDS) DISPONIBLE

Las Hojas de Seguridad (SDS) para este kit, y para todos los kits de Neogen, están disponibles en la página electrónica de Neogen [foodsafety.neogen.com/sp](http://foodsafety.neogen.com/sp), o llamando a Neogen al +1 800.234.5333 o +1 517.372.9200.

## TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite [www.neogen.com/en/terms-and-conditions](http://www.neogen.com/en/terms-and-conditions) para los términos y condiciones completos de Neogen.

## GARANTÍA

Neogen Corporation no hace ningún tipo de garantía expresa o implícita, excepto que materiales de los que los productos están hechos son de calidad estándar. Si cualquiera de sus materiales está defectuoso, Neogen proveerá un remplazo del producto. El comprador asume toda la responsabilidad y riesgo resultante del uso de este producto. No hay ningún tipo de garantía de comercialización de este producto o del rendimiento del mismo para ningún propósito. Neogen no será responsable por daños y perjuicios, incluyendo daños especiales o consecuentes, o gastos derivados directa o indirectamente del uso de este producto.



### Norteamérica

#### Oficinas Corporativas de Neogen

+1 800-234-5333 (EEUU/Canadá)  
[foodsafety@neogen.com](mailto:foodsafety@neogen.com)  
[foodsafety.neogen.com/sp](http://foodsafety.neogen.com/sp)

### Europa, Medio Oriente y Africa

#### Neogen Europe

+ 44 (0) 1292 525 600  
[info\\_uk@neogeneurope.com](mailto:info_uk@neogeneurope.com)  
[foodsafety.neogen.com/uk](http://foodsafety.neogen.com/uk)

### México

#### Neogen Latinoamérica

+52 (55) 5254-8235  
[informacion@neogenlac.com](mailto:informacion@neogenlac.com)  
[foodsafety.neogen.com/sp](http://foodsafety.neogen.com/sp)

### Brasil

#### Neogen do Brasil

+55 19 3935.3727  
[info@neogendobrasil.com.br](mailto:info@neogendobrasil.com.br)  
[foodsafety.neogen.com/pt](http://foodsafety.neogen.com/pt)

### China

#### Neogen Bio-Scientific Technology

+86 21 6271 7013  
[info@neogenchina.com.cn](mailto:info@neogenchina.com.cn)  
[www.neogenchina.com.cn](http://www.neogenchina.com.cn)

### India

#### Neogen Food and Animal Security

**+91 484 2306598, 2301582**  
[info@neogenindia.com](mailto:info@neogenindia.com)  
[www.neogenindia.com](http://www.neogenindia.com)