

Read instructions carefully before starting test

ALERT[®] **for Gliadin**

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

GLIADIN

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

Alert for Gliadin is intended for the qualitative analysis of ingredients, clean-in-place solutions, finished food products, and environmental surfaces intended to be gluten-free for the presence of gliadins and prolamins found in wheat, rye and barley.

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.

ALERT[®] for Gliadin

ASSAY PRINCIPLES

Alert 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 saline buffer and diluted samples are added to antibody-coated wells (capture antibody) where gluten 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.

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. 24 antibody-coated microwells
2. 1 yellow-labeled dropper bottle of 10 ppm gliadin control (25 ng/mL gliadin)
3. 1 blue-labeled dropper bottle of conjugate
4. 1 green-labeled dropper bottle of K-Blue[®] Substrate
5. 1 red-labeled dropper bottle of Red Stop solution
6. 20 prefilled dilution dropper bottles of 3.9 mL PBS
7. 1 foil pouch containing enough 10 mM PBS dry powder to prepare 1 L of dilution solvent
8. 1 wide-mouth bottle containing enough 10 mM PBS-Tween wash buffer concentrate to prepare 1 L in distilled or deionized water (pH 7.4)
9. 30 g of extraction additive in a specimen cup
10. Plastic 1 g scoop to measure extraction additive

MATERIALS RECOMMENDED BUT NOT PROVIDED

1. Orbital rotator, shaker or vortex to hold 50 cc centrifuge tubes for a 1 g sample or shaker or shaker water bath with clamps adjusted to hold 125 mL (4 oz) extraction bottles for a 2 g sample
2. Allergen Environmental Swabbing Kit (Neogen item 8432S)
3. Scale capable of weighing 1 + 0.1 g (Neogen item 9427), or scale capable of weighing 0.25 ± 0.01 g if using cocktail solution
4. 2 1 L bottles to prepare washing solution, extract solution (Neogen item 9472)
5. Timer (Neogen item 9426)
6. Microwell holder (Neogen item 9402)
7. Pipettor, 100 µL (Neogen item 9272, 9278, or 9276)
8. Pipette tips (Neogen item 9410)
9. Wash bottle (Neogen item 9400)
10. Paper towels or equivalent absorbent material
11. Waterproof marker
12. Distilled or deionized water
13. Laboratory grade ethanol (190 proof)
14. Special extraction additive for dark chocolate, cocoa and tannin (Neogen item 8482)
15. 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 a chemical hood when using the cocktail solution to analyze heat processed samples.
3. Components of Alert 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 six wells per test.
9. Use only incubation times specified; others may give inaccurate results.

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. **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 ensure thorough mixing.
NOTE: Discard unused portions of extraction solution and wash buffer when the test kit has been used completely.
3. **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.
4. **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.

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, rotator or vortex

1. Prepare 40% ethanol extraction solution by combining 4 parts ethanol with 6 parts distilled water.
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.
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. **ALTERNATIVE:** Vortex on high speed for **4 minutes**.
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 pre-filled dilution dropper bottle containing 3.9 mL of PBS. (Cap and tip must be removed first, then reinserted).
8. To mix, 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.
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.
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 μ L of the upper layer of the extract and transferring it to a pre-filled dilution dropper bottle containing 3.9 mL of PBS. (Cap and tip must be removed first, then reinserted).
8. To mix, invert several times by hand.
9. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

C. Extraction of heat processed commodities

These commodities require a special pre-extraction cocktail solution that renature the heated gluten and allowed the proper determination of the gluten in the sample (Neogen item 8483). In analyzing heat processed samples, follow these instructions. Prefilled dilution bottles cannot be used for this extraction procedure.

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 4.
3. It is recommended to perform the extraction with the cocktail extraction additive under a chemical hood.
4. Weigh out 0.25 g sample to 50 cc screw cap centrifuge tube.
5. Add 2.5 mL of extraction cocktail solution (dilution factor 1:10).
6. Cap and vortex **10–20 seconds** to homogenize cocktail and sample.
7. Incubate **40 minutes** at 50°C (water bath or oven).
8. Remove samples and let cool for **5–10 minutes**.
9. Add 1 scoop of powdered additive.
10. 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 1:40).
11. Shake (150–200 rpm) for 1 hour at room temperature on a rotator (tube on its side).
12. Centrifuge sample (if necessary) for **5 minutes** at 2500 rpm.
13. Dilute the sample 1:10 into 10 mM PBS, pH 7.4 (200 μ L sample into 1.8 mL PBS).
14. 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 well for each sample to be tested plus 1 well for the control, and place into the well holder.
2. Mix each reagent by swirling its dropper bottle prior to use.
3. Add 3 drops from the yellow-labeled control dropper bottle to the first well. Add 3 drops from each diluted sample dropper bottle to a respective well as indicated in the template below. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.

Control S1 S2 S3 S4 S5

4. Incubate microwells **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
5. Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer, fill each well and shake out. Repeat 5 times. Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on absorbent towel.
6. Add 3 drops from the blue-labeled conjugate dropper bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
8. Shake out the contents of the wells. Using a wash bottle filled with wash buffer, fill each well and shake out. Repeat 5 times. Remove excess wash buffer by turning wells upside down and vigorously tapping wells on absorbent towel.
9. Add 3 drops from the green-labeled substrate dropper bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface.
10. Incubate for **10 minutes** at room temperature (18–30°C, 64–86°F).
11. Add 3 drops from the red-labeled Red Stop dropper bottle to each well. Mix for **20 seconds** by sliding the microwell holder back and forth on a flat surface. The results are now ready to be interpreted.

INTERPRETATION OF RESULTS

Visually compare the color of a sample well to the color of the control well. If the sample well has **more blue color** than the control well, the sample tests positive for gliadin contamination of **more than 10 ppm**. If the sample well has **less blue color or more red color** than the control well, the sample contains **less than 10 ppm** of gliadin contamination. **NOTE:** Standard controls were made from wheat gliadin and calculated as gliadin. Approximately 50% of the gluten is available as gliadin. Therefore, 10 ppm gliadin is equal to 20 ppm gluten.

ALTERNATIVE: Read wells (wipe bottom of wells first) in a microwell reader with a 650 nm filter. If the sample well has an optical density (OD) higher than the control well, the sample is positive for gliadin contamination of more than 10 ppm. If the sample well has an OD lower than the control well, the sample contains less than 10 ppm of gliadin contamination.

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.

MSDS INFORMATION AVAILABLE

Material safety data sheets (MSDS) are available for this test kit, and all of Neogen's test kits, on Neogen's website at www.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/Corporate/termsconditions.html.

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.

TEST 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*

Sanitation

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

Food allergens

- Almonds, crustaceans, eggs, gliadin, hazelnut, lupine, milk, 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**

620 Leshler Place, Lansing, MI 48912 USA
800/234-5333 (USA/Canada) or 517/372-9200
Fax: 517/372-2006 • foodsafety@neogen.com
www.neogen.com

Europe, Middle East and Africa**Neogen Europe**

The Dairy School, Auchincruive, Ayr
KA6 5HU Scotland, UK
+ 44 (0) 1292 525 600
Fax: + 44 (0) 1292 525 601
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

Mexico**Neogen Latinoamérica**

Prolongación 5 de Mayo #27
Col. Parque Industrial Naucalpan
Naucalpan, Estado de Mexico C.P. 53489
+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-1198
Fax: +52 (55) 5531-1647
informacion@neogenlac.com • www.neogenlac.com

Brazil**Neogen do Brasil**

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João
Narezi, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402
Tel: +55 19 3935.3727
info@neogendobrasil.com.br • www.neogen.com

Por favor lea las instrucciones cuidadosamente antes de realizar la prueba

ALERT[®]

para Gliadina

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

GLIADINA

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 es una reacción inmunitaria específica a un número de proteínas del trigo, incluyendo la gliadina, albúmina, globulina y glutenina. La celiacía es una reacción crónica a las proteínas del gluten que resulta en una deficiencia en la absorción de nutrientes en el intestino delgado. Aquellos que deben evitar la ingestión de gluten basan sus decisiones nutricionales en el etiquetado de alimentos para tomar una decisión segura e informativa sobre 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

Alert para Gliadina está indicado para el análisis cualitativo de ingredientes, soluciones de limpieza en lugar, 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

Este kit de análisis ha sido diseñado para ser utilizado por personal de control de la calidad y otros que tengan familiaridad con alimentos posiblemente contaminados con gluten. Debido a la importancia de la técnica, los usuarios deben ser entrenados por un representante de Neogen o por alguien que haya completado el entrenamiento de Neogen.

FUNDAMENTO DEL ANÁLISIS

Alert 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 40% agitándolo con un agitador o rotador. El extracto se diluye con la solución de Tampón Fosfato Salino y las muestras diluidas se agregan a los micropocillos tapizados con un anticuerpo 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 la 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 un 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.

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. 24 micropocillos tapizados con anticuerpo
2. 1 gotero con etiqueta amarilla de control con 10 ppm de gliadina (25 ng/mL de gliadina)
3. 1 gotero con etiqueta azul, de conjugado
4. 1 gotero con etiqueta verde de sustrato K-Blue®
5. 1 gotero con etiqueta roja de solución "Red Stop"
6. 20 goteros de dilución precargados con 3.9 mL de Tampón Fosfato Salino
7. 1 bolsa de aluminio con polvo seco de Tampón Fosfato Salino 10 mM suficiente para preparar 1 L de solvente de dilución
8. 1 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)
9. 30 g de aditivo de extracción en un envase para especímenes
10. Cuchara de plástico dosificadora de 1 g para medir el aditivo de extracción

MATERIALES RECOMENDADOS (NO VIENEN INCLUIDOS)

1. Agitador o rotador apto para tubos de centrifuga de 50 cc para una muestra de 1 g, o un agitador o baño de maría con una prensa de sujeción para la botella de extracción de 125 mL (4 onzas) para una muestra de 2 g
2. Kit de hisopos para la colección alérgenos ambientales (Producto Neogen 8432S)
3. Una balanza apta para pesar 1 ± 0.1 g (Producto Neogen 9427) o una balanza apta para pesar 0.25 ± 0.01 g si se usa el cóctel de renaturalización (solución)
4. 2 botellas de 1 L para preparar la solución de lavado y la solución de extracción (Producto Neogen 9472)
5. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
6. Estante para micropocillos (Producto Neogen 9402)
7. Pipeta, 100 μ L (Producto Neogen 9272, 9278 o 9276)
8. Puntas de pipeta (Producto Neogen 9410)
9. Piseta (Producto Neogen 9400)
10. Toallas de papel o un material absorbente equivalente
11. Marcador resistente al agua
12. Agua destilada o desionizada
13. Etanol de calidad de laboratorio 95%
14. Aditivo especial de extracción para chocolate negro, cacao y tanino (Producto Neogen 8482)
15. Cóctel (solución) 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 Alert para Gliadina 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 la almendra y proteína de la 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 6 micropocillos por prueba.
9. El uso de periodos de incubación distintos a los especificados puede dar lugar a resultados erróneos.

NOTAS CON RESPECTO AL PROCEDIMIENTO

1. **Chocolate negro, cacao y tanino.** Si está realizando pruebas en productos en los cuales chocolate oscuro, cacao, y/o tanino estén presentes, tales como barras de chocolate y cacao en polvo, por favor, póngase en contacto con Neogen para el aditivo de extracción especial (Producto Neogen 8482). Agregue 1 cucharada del aditivo de extracción especial en adición a 1 cucharada del aditivo suministrado con el kit.
2. **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 del tampón para el lavado cuando el kit de prueba se haya usado por completo.
3. **Micropocillos de 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 el procedimiento de la prueba esté listo para iniciar.
4. **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 por rotación para mezclar bien.

PREPARACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Para analizar muestras que **han recibido 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 extraídas 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% mediante la combinación de 4 partes de etanol con 6 partes de agua destilada.
2. Agregue 1 g de muestra molida o 1 mL de muestra líquida a un tubo limpio de 50 cc.
3. Agregue 1 cucharada del aditivo de extracción al tubo.
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 agitador vórtex por **10 segundos**, para garantizar una mezcla completa.
5. Extraiga por agitación (150 rpm) en un agitador orbital o agitador por rotación, poniendo el tubo en su lado encima de la almohadilla del instrumento, manténgalo ajustado con un caucho o con cinta. Rote o agite a temperatura ambiental por **15 minutos**. **ALTERNATIVAMENTE:** Utilice el agitador en velocidad alta por **4 minutos**.
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 gotero de dilución precargado que contenga 3.9 mL de Tampón Fosfato Salino. (Primero quite la tapa y la punta, y luego reinsertelas).

8. Para mezclar, invierta el tubo 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.
2. Agregue 2 g de muestra molida o 2 mL de muestra líquida a un tubo de extracción limpio de 125 mL.
3. Agregue 1 cucharada del aditivo de extracción al tubo.
4. Agregue 20 mL (18 mL para muestras líquidas) de etanol al 40%, tape la botella y luego agítela vigorosamente a mano por **20 segundos** para garantizar una mezcla completa.
5. Extraiga agitando (150 rpm) en un agitador por **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. Deje descansar la botella por aproximadamente **10 minutos** para que la muestra pueda estabilizarse antes de retirar el extracto transparente. Centrifugue la muestra (si es necesario) por **10 minutos** a $\geq 2,500$ g a temperatura ambiental.
7. Diluya cada muestra en una proporción de 1:40; Extraiga 100 μ L de la porción superior del extracto y transfírala a un gotero de dilución precargado que contenga 3.9 mL de Tampón Fosfato Salino. (Primero quite la tapa y la punta, y luego reinsertelas).
8. Para mezclar, invierta el tubo 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 las muestras con tratamiento térmico y permite la detección apropiada de la gliadina en la muestra. En este procedimiento de extracción no puede utilizar botellas de dilución precargadas.

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 la nota de procedimiento n.º4.
3. 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.
4. Pese 0.25 g de muestra y colóquela en un tubo de centrifuga de 50 cm³ con tapa.
5. Agregue 2.5 mL del cóctel de renaturalización (proporción de dilución 1:10).
6. Tape y agite con el agitador por **10–20 segundos** para homogeneizar el cóctel y la muestra.
7. Incube por **40 minutos** a 50°C (baño de maría u horno).
8. Retire las muestras y déjelas entibiar de **5–10 minutos**.
9. Agregue 1 cucharada de aditivo en polvo.
10. Agregue 7.5 mL de etanol al 55% y agite en el agitador de **10–20 segundos** (La concentración final del etanol será 41% y la proporción de dilución de la muestra 1:40).
11. Agite (150–200 rpm) por 1 hora a temperatura ambiental en un rotador (tubo acostado).
12. Centrifugue la muestra (si es necesario) por **5 minutos** a 2,500 rpm.
13. Diluya la muestra en una proporción de 1:10 en Tampón Fosfato Salino 10 mM, pH 7.4 (200 μ L de la muestra en 1.8 mL de Tampón Fosfato Salino).
14. 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 18–30°C (64–86°F) antes de utilizarlos.

1. Retire 1 micropocillo por cada muestra que vaya a ser analizada, además de 1 micropocillo marcado en rojo para el control, y colóquelos en el estante para micropocillos.
2. Mezcle cada reactivo rotando el gotero antes de uso.
3. En el primer micropocillo agregue 3 gotas del gotero de control con la etiqueta amarilla. Agregue 3 gotas de cada gotero con muestras diluidas a sus micropocillos respectivos, según se indica en la plantilla a continuación. Mezcle durante **20 segundos** deslizando el estante para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.

Control	S1	S2	S3	S4	S5
---------	----	----	----	----	----

4. Incube los micropocillos por **10 minutos** a temperatura ambiental (entre 18–30°C (64–86°F)).
5. 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 el lavado invirtiendo los micropocillos y golpeándolos vigorosamente sobre una toalla absorbente.
6. Agregue 3 gotas a cada micropocillo del gotero con la etiqueta azul que contiene el conjugado. Mezcle por **20 segundos** deslizando el estante para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.
7. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F).
8. 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.
9. Agregue 3 gotas a cada micropocillo del gotero con la etiqueta verde que contiene el sustrato. Mezcle por **20 segundos** deslizando el estante para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.
10. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiental 18–30°C (64–86°F).
11. Agregue 3 gotas a cada micropocillo del del gotero con la etiqueta roja que contiene el Red Stop. Mezcle por **20 segundos** deslizando el estante para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana. Los resultados están listos para ser interpretados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Compare visualmente el color de un micropocillo de muestra con el color del micropocillo de control. Si la muestra es **azul más intenso** que el control, la prueba de la muestra tiene un resultado positivo con respecto a la contaminación de gliadina, **que excede las 10 ppm**. Si la muestra es **azul menos intenso o más rojizo** que el control, la muestra está contaminada con **menos de 10 ppm** de gliadina. **NOTA:** Los controles estándar se hicieron con gliadina de trigo y se calcularon como gliadina. Aproximadamente el 50% del gluten está disponible como gliadina. Por lo tanto, 10 ppm de gliadina equivalen a 20 ppm de gluten.

ALTERNATIVA: Lea los micropocillos (primero pase un paño por la superficie inferior) en un lector de micropocillos con un filtro de 650 nm. Si la densidad óptica (DO) del micropocillo que contiene la muestra es más alta que la del control, la prueba de la muestra tiene un resultado positivo con respecto a la contaminación de gliadina, que excede las 10 ppm. Si la DO del micropocillo que contiene la muestra es más baja que la del control, la muestra contiene menos de 10 ppm de gliadina.

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.

DISPONIBILIDAD DE INFORMACIÓN SOBRE LAS FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS MATERIALES

Puede obtener fichas de seguridad de los materiales para este kit y para todos los kits analíticos de Neogen en www.neogen.com, o llamando a los números +1 800-234-5333 o +1 517-372-9200.

TÉRMINOS Y CONDICIONES

Por favor visite www.neogen.com/Corporate/termsconditions.html 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 están defectuosos, 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.

KITS ANALÍTICOS DISPONIBLES EN NEOGEN**Toxinas naturales**

- Aflatoxina, deoxinivalenol (DON), ocratoxina, zearalenona, toxinas T-2/HT-2, fumonisina, histamina

Bacterias presentes en los alimentos

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

Saneamiento

- Trifosfato de adenosina (ATP), hongo levaduriforme y moho, número total de plaquetas, *E. coli* genérico y total de coliformes, residuos proteínicos

Alérgenos en alimentos

- Almendras, huevos, gliadina, avellana, altramuza, leche, mostaza, maní, ajonjolí, crustáceos, soja, nuez de nogal

Modificación genética

- CP4 (Roundup Ready®)

Subproductos para rumiantes

- Harina de carne y huesos, concentrado animal

Identificación de especies

- Muestras de carnes crudas y cocinadas

**Norteamérica****Sede central de Neogen**

620 Leshler Place, Lansing, MI 48912, EE. UU.
800-234-5333 (EE. UU./Canadá) o 517-372-9200
Fax: 517-372-2006 • foodsafety@neogen.com
www.neogen.com

Europa, Oriente Próximo y África**Neogen Europa**

The Dairy School, Auchincruive, Ayr
KA6 5HU Scotland, UK
+ 44 (0) 1292 525 600
Fax: + 44 (0) 1292 525 601
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

México**Neogen Latinoamérica**

Prolongación 5 de Mayo #27
Col. Parque Industrial Naucalpan
Naucalpan, Estado de Mexico C.P. 53489
+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-1198
Fax: +52 (55) 5531-1647
informacion@neogenlac.com • www.neogenlac.com

Brasil**Neogen do Brasil**

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João
Narezzi, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402
Tel.: +55 19 3935.3727
info@neogendobrasil.com.br • www.neogen.com