

Read instructions carefully before starting test

ALERT[®]

for Gliadin R5

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 who must avoid gluten 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 R5 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 gliadin 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.

ASSAY PRINCIPLES

Alert for Gliadin R5 is a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA). Gliadin is extracted from samples with a 60% 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 R5 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.

ALERT[®] for Gliadin R5

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 (20 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 4.9 mL PBS
7. 1 foil pouch containing enough 10 mM PBS dry powder to prepare 1 L of dilution solvent
8. 1 widemouth 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 or shaker 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 renaturing cocktail solution
4. Gliadin renaturing cocktail solution for analysis of heat processed samples (Neogen item 8515, 8515S, or 8515B)
5. 2 1 L bottles to prepare washing solution, extract solution (Neogen item 9472)
6. Timer (Neogen item 9426)
7. Microwell holder (Neogen item 9402)
8. Pipettor, 100 μ L (Neogen item 9272, 9278 or 9276)
9. Pipette tips (Neogen item 9410)
10. Wash bottle (Neogen item 9400)
11. Paper towels or equivalent absorbent material
12. Waterproof marker
13. Distilled or deionized water
14. Laboratory grade ethanol (190 proof)
15. Centrifuge (optional)

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. Components of Alert for Gliadin R5, 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.
3. 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.
4. Bring kits to room temperature (18–30°C, 64–86°F) prior to use.
5. Do not use kit components beyond expiration date.
6. Do not mix reagents from one kit with reagents from a kit with a different serial number.
7. Do not run more than 6 wells per test.
8. Use only incubation times specified; others may give inaccurate results.

PROCEDURAL NOTES

1. **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.
2. **Wash buffer.** Prepare the wash buffer solution by pouring the wash buffer concentrate into a 1 L container. Add 960 mL of distilled or deionized water. Swirl to assure thorough mixing.
NOTE: Discard unused portions of extraction solution and wash buffer when the test kit has been used completely.
3. **Extraction additive.** Use extraction additive with all the samples utilizing procedure A or B (non-heat processed samples). Heat processed samples (procedure C) should **only** use the extraction additive if samples contain buckwheat, chestnut flour or tannins/phenolic compounds such as chocolate, coffee, cocoa, wine, herbs or fruits.
4. **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 60% ethanol extraction solution by combining 6 parts ethanol with 4 parts distilled water.
2. Add 1 g ground sample, or 1 mL liquid sample, to a clean 50 cc tube.
3. Add 1 level scoop of extraction additive to the tube.
4. Add 10 mL (9 mL for liquid samples) of 60% ethanol to the tube, cap tightly, then shake the tube vigorously by hand for about **1 minute**, or vortex for **30 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 **10 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. If necessary, centrifuge sample for **10 minutes** at $\geq 2,500$ g at room temperature.
7. Dilute each sample 1:50 by withdrawing 100 μ L of the upper layer of the extract and transferring it to a prefilled dilution dropper bottle containing 4.9 mL of PBS. (Cap and tip must be removed first, then reinserted).
8. To mix, invert several times by hand or vortex for **5 seconds**.
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 60% ethanol extraction solution by combining 6 parts ethanol with 4 parts distilled water.
2. Add 2 g ground sample, or 2 mL liquid sample, to a 125 mL clean extraction bottle.
3. Add 1 level scoop of extraction additive to the bottle.
4. Add 20 mL (18 mL for liquid samples) of 60% 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 **10 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. If necessary, centrifuge sample for **10 minutes** at $\geq 2,500$ g at room temperature.
7. Dilute each sample 1:50 by withdrawing 100 μ L of the upper layer of the extract and transferring it to a prefilled dilution dropper bottle containing 4.9 mL of PBS. (Cap and tip must be removed first, then reinserted.)
8. To mix, invert several times by hand or vortex for **5 seconds**.
9. Test diluted samples within **2–3 hours** of extraction.

C. Extraction of heat processed commodities

Heat processed commodities require the gliadin renaturing cocktail solution (Neogen item 8515) that renatures the heated sample and allows the proper determination of the gliadin in the sample. Prefilled dilution bottles **cannot** be used for this extraction procedure.

1. Prepare 80% ethanol extraction solution by combining 8 parts ethanol with 2 parts distilled water.
2. Prepare sample extract dilution solution (PBS) as detailed in procedural note 1.
3. Weigh out 0.25 g sample to 50 cc screw cap centrifuge tube.
4. Add 2.5 mL of renaturing cocktail solution.
5. If samples contain buckwheat, chestnut flour or tannins/phenolic compounds such as chocolate, coffee, cocoa, wine, herbs or fruits, add 1 level scoop of extraction additive. For all other commodity types, do not add extraction additive.
6. Cap and vortex **30 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 7.5 mL of 80% ethanol and vortex again for **10–20 seconds**.
10. Shake (150–200 rpm) for **1 hour** at room temperature on a rotator (tube on its side).
11. Centrifuge sample (if necessary) for **10 minutes** at $\geq 2,500$ g at room temperature.
12. Dilute the sample 1:12.5 into 10 mM PBS, pH 7.4 (200 μ L sample into 2.3 mL PBS)
13. Samples are ready to run.

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 5HW Scotland, UK
+ 44 (0) 1292 525 600
Fax: + 44 (0) 1292 525 601
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

Mexico**Neogen Latinoamérica**

Darwin No. 83, Col. Anzures, México, 11590 D.F.
+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-0111,
+52 (55) 5531-2837
Fax: +52 (55) 5531-1647
informacion@neogenlac.com • www.neogen.com

Brazil**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

Por favor lea las instrucciones cuidadosamente antes de realizar la prueba

ALERT[®] para Gliadina R5

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 consiste de una respuesta inmunitaria específica a un gran 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 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

El kit de Alert para Gliadina R5 está indicado para el análisis cualitativo 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 Alert para Gliadina R5 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

Alert para Gliadina R5 es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (S-ELISA). La gliadina es extraída de la muestra con una solución de etanol al 60 % agitando 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 la enzima R5 (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.

ALERT® para Gliadina R5

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 cubiertos con anticuerpo
2. 1 gotero con etiqueta amarilla de control con 10 ppm de gliadina (20 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 4.9 mL de tampón fosfato salino (PBS)
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 que soporte tubos de centrifuga de 50 cm³ 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. Equipo de hisopos para la colección alérgenos ambientales (Producto Neogen 8432S)
3. 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 (solución) de renaturalización
4. Cóctel (solución) de renaturalización de gliadina para el análisis de muestras con tratamiento térmico (Producto Neogen 8515, 8515S o 8515B)
5. 2 botellas de 1 L para preparar la solución de lavado y la solución de extracción (Producto Neogen 9472)
6. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
7. Estante para micropocillos (Producto Neogen 9402)
8. Pipeta, 100 µL (Producto Neogen 9272, 9278 o 9276)
9. Puntas de pipeta (Producto Neogen 9410)
10. Piseta (Producto Neogen 9400)
11. Toallas de papel o un material absorbente equivalente
12. Marcador resistente al agua
13. Agua destilada o desionizada
14. Etanol de calidad de laboratorio 95%
15. Centrifuga (opcional)

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. Los componentes de Alert 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.
3. 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.
4. Permita que los kits se entibien a temperatura ambiental (18-30°C (64-86°F)) antes de utilizarlos.
5. No utilice componentes del kit que estén vencidos.
6. No mezcle reactivos de un kit con los reactivos de otro kit con un número de serie diferente.
7. No trabaje con más de 6 micropocillos por prueba.
8. El uso de periodos de incubación distintos a los especificados puede dar lugar a resultados erróneos.

NOTAS CON RESPECTO AL PROCEDIMIENTO

1. **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 garantizar que se mezcle completamente.
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 completamente.
NOTA: Deseche todas las partes que no se usaron de la solución de extracción y el tampón para el lavado cuando el equipo de prueba se haya usado completamente.
3. **Aditivo de extracción.** Use el aditivo de extracción con todas las muestras según el procedimiento A o el B (muestras sin tratamiento térmico). Las muestras con tratamiento térmico (procedimiento C) **solo** deben utilizar el aditivo de extracción si las muestras contienen trigo sarraceno, harina de castaña o taninos/compuestos fenólicos, como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas.
4. **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**. Para 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 60% mediante la combinación de 6 partes de etanol con 4 partes de agua destilada.
2. Agregue 1 g de muestra molida o 1 mL de muestra líquida a un tubo limpio de 50 cm³.
3. Agregue 1 cucharada del aditivo de extracción al tubo.
4. Agregue 10 mL (9 mL para muestras líquidas) de etanol al 60% al tubo, tápele firmemente, agite el tubo vigorosamente a mano por **1 minuto**, o en un agitador por **30 segundos**, para garantizar que se mezcle completamente.
5. Extraiga agitando (150 rpm) en un agitador o rotador orbital colocando el tubo de lado sobre la almohadilla plana del instrumento y sosteniéndolo firmemente con cinta o banda elástica. Rote o agite por **10 minutos** a temperatura ambiental.
6. Retire el tubo y permita que se sedimente en un estante por **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 1:50; Extraiga 100 μ L de la porción superior del extracto y transfíerala a un gotero de dilución precargado que contenga 4.9 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 o utilice un agitador por **5 segundos**.
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 60% , combine 6 partes de etanol con 4 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 de aditivo de extracción a la botella.
4. Agregue 20 mL (18 mL para muestras líquidas) de etanol al 60%, 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 **10 minutos** a temperatura ambiental (un baño maría con agitación puede funcionar, pero sin elevar la temperatura). Retire la botella del agitador o del baño.
6. Retire el tubo y permita que se sedimente en un estante por **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 1:50; Extraiga 100 μ L de la porción superior del extracto y transféralo a un gotero de dilución precargado con 4.9 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 o agítelo en un agitador por **5 segundos**.
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 (solución) de renaturalización de la gliadina (Producto Neogen 8515) esto renaturaliza las muestras con tratamiento térmico y permite la determinación apropiada de la gliadina en la muestra. En este procedimiento de extracción **no** se pueden usar botellas de dilución precargadas.

1. Prepare la solución de extracción de etanol al 80% combine 8 partes de etanol con 2 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.º1.
3. Pese 0.25 g de muestra y colóquela en un tubo de centrifuga de de 50 cm³ con una tapa.
4. Agregue 2.5 mL del cóctel (solución) de renaturalización.
5. Si las muestras contienen trigo sarraceno, harina de castaña o taninos/compuestos fenólicos, como chocolate, café, cacao, vino, hierbas o frutas, agregue 1 cucharada del aditivo de extracción. Para todos los demás tipos de productos, no agregue el aditivo de extracción.
6. Tape y agite con el agitador vórtex por **30 segundos** para homogeneizar el cóctel y la muestra.
7. Incube por **40 minutos** a 50°C (baño maría u horno).
8. Retire las muestras y déjelas enfriar durante **5-10 minutos**.
9. Agregue 7.5 mL de etanol al 80% y agite en el agitador de **10-20 segundos**.
10. Agite (150-200 rpm) por **1 hora** a temperatura ambiental en un rotador (tubo acostado).
11. Centrifugue la muestra (si es necesario) por **10 minutos** a $\geq 2,500$ g a temperatura ambiental.
12. Diluya la muestra en una proporción de 1:12.5 en Tampón Fosfato Salino 10 mM, pH 7.4 (200 μ L de la muestra en 2.3 mL de Tampón Fosfato Salino).
13. Las muestras esan listas para analizar.

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 pocillo 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 pocillo, agregue 3 gotas del gotero de control con la etiqueta amarilla. Agregue 3 gotas de cada gotero con muestras diluidas a su respectivo pocillo, según se indica en la plantilla a continuación. Mezcle por **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 pocillo 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.
6. Agregue 3 gotas a cada micropocillo del gotero con la etiqueta azul que contiene el conjugado. Mezcle por **20 segundos** deslizando el soporte para los micropocillos de atrás hacia adelante en una superficie plana.
7. Incube por **10 minutos** a temperatura ambiental (entre 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 pocillo 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 pocillo 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 (entre 18-30°C (64-86°F)).
11. Agregue 3 gotas a cada pocillo 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 pocillo de muestra con el color del pocillo de control. Si la muestra es de **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 rojo** 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 pocillo 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 pocillo 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.

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

620 Leshner 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 5HW Escocia, Reino Unido
+ 44 (0) 1292 525 600
Fax: + 44 (0) 1292 525 601
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

México**Neogen Latinoamérica**

Darwin No. 83, Col. Anzures, México, D.F. 11590
+52 (55) 5254-8235, +52 (55) 5203-0111,
+52 (55) 5531-2837
Fax: +52 (55) 5531-1647
informacion@neogenlac.com • www.neogen.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