



Gebrauchsanweisung

Dopamine ELISA

Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Dopamin in Plasma und Urin



Art. Nr. EA608/96



12 x 8



2 – 8 °C

 D00  Wesamin GmbH & Co. KG • Graff 1 • 24568 Oersdorf • Germany

Distributor: DLD Diagnostika GmbH • Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Germany

Tel. +49 40 5558710 • Fax +49 40 55587111 • contact@dld-diagnostika.de • www.dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung und Testprinzip	3
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
3	Lagerung und Haltbarkeit	4
4	Inhalt des Kits	5
5	Probengewinnung und -lagerung	7
6	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	8
7	Testdurchführung ELISA	10
8	Auswertung	11
9	Testcharakteristika	12
10	Änderungen	14
	Pipettierschema – Probenvorbereitung	15
	Pipettierschema – ELISA	16

Verwendete Symbole



In-Vitro Diagnostikum



EG Konformitätserklärung



Inhalt



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Temperaturbegrenzung



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Bestellnummer des
Herstellers



Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole



Gefahr



Achtung

1 Einführung und Testprinzip

Catecholamine ist die Bezeichnung für eine Gruppe von aromatischen Aminen (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin, sowie deren Derivate), die als Hormone bzw. Neurotransmitter wirken. Adrenalin und Noradrenalin werden aus Dopamin gebildet. Sie wirken auf die Herzmuskulatur und den Stoffwechsel (Adrenalin), sowie auf den peripheren Kreislauf (Noradrenalin) und dienen so der Adaption des Körpers an akuten und chronischen Stress.

Eine vermehrte Bildung von Catecholaminen findet man bei Tumoren des chromaffinen Systems (Phäochromozytom, Neuroblastom, Ganglioneurom). Außerdem findet man erhöhte oder erniedrigte Catecholaminwerte bei Hypertonie, degenerativen Erkrankungen des Herzens, Schizophrenie und der manisch-depressiven Erkrankung. Bei Kindern mit Verdacht auf ein Neuroblastom ist die Bestimmung von Dopamin und seiner Derivate von besonderer diagnostischer Bedeutung.

Der Dopamin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von Dopamin in Plasma und Urin.

Dopamin wird mittels eines cis-Diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgels extrahiert, acyliert und anschließend enzymatisch in N-Acyl-3-Methoxytyramin umgewandelt.

Der Dopamin-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Dopamin ist an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden. Acyliertes Dopamin aus der Probe und an die Festphase gebundenes Dopamin konkurrieren um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Wenn sich das System im Gleichgewicht befindet, wird der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex in einem Waschschrift entfernt und der entsprechend gebundene Komplex mittels eines Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats nachgewiesen und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Die TMB/POD-Reaktion wird gestoppt und bei 450 nm gemessen. Die Konzentration des an die Festphase gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Dopamins in der Probe.

2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Vor der Testdurchführung sollte die Gebrauchsanweisung vollständig gelesen und deren Inhalt verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren, die von einer zertifizierten Stelle untersucht wurden. Die Reagenzien sollten trotzdem wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten und Lagerbedingungen sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Patientenproben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Vermeiden Sie alle Handlungen, die zu einem Verschlucken, Einatmen oder Injizieren der Reagenzien führen könnten. Niemals mit dem Mund pipettieren.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet werden.

3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur geliefert und ist anschließend bei Lagerung zwischen 2 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch ist der Kit bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Reagenzien ist auf dem jeweiligen Flaschenetikett angegeben. Die Haltbarkeit und die Lagerung der vorbereiteten Reagenzien werden unter 6.1 geregelt.

Alle Reagenzien müssen vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und sofort nach Gebrauch wieder kühl gestellt werden.

4 Inhalt des Kits

4.1 Reagenzien für die Probenvorbereitung:

Extraktionsplatte

48 Vertiefungen beschichtet mit Boronat-Affinitätsgel

EX-PLATE

2 Stück

Extraktionspuffer

6 ml, gebrauchsfertig

EX-BUFF

1 Fläschchen

Salzsäure

21 ml, gebrauchsfertig, 0,025 M HCl

HCL

1 Fläschchen

Standards (1 - 7)

Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:

CAL 1 - CAL 7

7 Fläschchen

Standards	1	2	3	4	5	6	7
Dopamin (ng/ml)	0	1,5	10	40	160	640	2.560
Dopamin (nmol/l)	0	9,8	65,3	261	1.045	4.179	16.717

Falls nur Urine bestimmt werden sollen, kann Standard 2 weggelassen werden.

Falls nur Plasmen bestimmt werden sollen, kann Standard 7 weggelassen werden.

Kontrolle 1 & 2

Je 4 ml, gebrauchsfertig, Konzentrationen:
siehe QC Zertifikat

CON 1 & CON 2

2 Fläschchen

Acylierungs-Reagenz

6 ml, gebrauchsfertig, Enthält DMSO und DMF
Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien,, z.B. Plastikschälchen.
Sie reagieren nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen

ACYL-REAG

1 Fläschchen



Achtung



Gefahr

Acylierungs-Puffer

20 ml, gebrauchsfertig

ACYL-BUFF

1 Fläschchen

Enzym

Je 2 ml, lyophilisiert,
Catechol-O-Methyltransferase

ENZYME

3 Fläschchen

Coenzym 1 ml, gebrauchsfertig, S-Adenosyl-L-Methionin	COENZYME	1 Fläschchen
---	-----------------	--------------

Enzym-Puffer 2 ml, gebrauchsfertig	ENZYME-BUFF	1 Fläschchen
--	--------------------	--------------



Achtung

4.2 Reagenzien für den ELISA

Dopamin-Antiserum 6 ml, gebrauchsfertig, vom Kaninchen, grün gefärbt	AS-DA	1 Fläschchen
--	--------------	--------------



Achtung

MT-Streifen Mikrotiterstreifen mit je 8 Kavitäten, einzeln abbrechbar Vorbeschichtet mit: Dopamin, farblos	STRIPS-DA	12 Stück
---	------------------	----------

POD Konjugat Je 12 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat	CONJ	1 Fläschchen
--	-------------	--------------



Achtung

Waschpuffer 20 ml, Konzentrat, Inhalt mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen	WASH	2 Fläschchen
--	-------------	--------------

Substrat 12 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig	SUB	1 Fläschchen
--	------------	--------------

Stopplösung 12 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3M Schwefelsäure	STOP	1 Fläschchen
---	-------------	--------------

Haftklebefolie gebrauchsfertig	FOIL	10 Stück
--	-------------	----------

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten)

- Pipetten für 20, 50, 300, 1000 μ l
- Multipipetten für 20, 50, 100, 150, 200, 250 μ l und 1 ml
- Schüttler (horizontal)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für die Messung von Mikrotiterplatten (450 nm)
- Destilliertes Wasser

5 Probengewinnung und -lagerung

5.1 Plasma

Für den Test sollte EDTA-Plasma eingesetzt werden. Bei der Blutentnahme müssen bestimmte Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, da durch psychische und physische Belastungen des Patienten die Konzentration der Catecholamine stark ansteigen kann. Es empfiehlt sich, dass der Patient mit liegender Kanüle ruht und die Blutentnahme erst 20 - 30 Minuten nach Venenpunktion erfolgt.

Hämolytische, ikterische und insbesondere lipämische Plasmen sollten im Assay nicht eingesetzt werden, da sie zu falsch niedrigen Werten führen können.

Das Plasma kann bis zu 6 Stunden bei 2 – 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C bis zu 1 Woche gelagert werden.

5.2 Urin

Der gesamte Urin, der während einer Periode von 24 Stunden ausgeschieden wird, wird in einem Behälter, der 10 – 15 ml 6 N Salzsäure als Konservierungsmittel enthält, gesammelt. Direktes Sonnenlicht sollte vermieden werden. Das Gesamtvolumen wird bestimmt und ein Aliquot für die Messung entnommen. Bei Verdacht auf eine Nierenfunktionsstörung sollte auch eine Kreatininbestimmung durchgeführt werden. Urinproben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 6 Monate gelagert werden.

Urine vor der Verwendung mischen und zentrifugieren.

6 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

6.1.1 Vorbereitung des Waschpuffers

Inhalt des Fläschchens **WASH** (20 ml) mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch bei 2 – 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar.

Wird der Kit in mehreren Ansätzen verwendet, sollte nur die dafür benötigte Menge Waschpuffer angesetzt werden.

6.1.2 Vorbereitung des Enzymmixes

ACHTUNG: Der Enzymmix darf erst 10 – 15 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden. Nach Gebrauch ist der Rest zu verwerfen.

Inhalt eines Fläschchens **ENZYME** mit 2 ml destilliertem Wasser auflösen. Anschließend 0,3 ml **COENZYME** und 0,3 ml **ENZYME-BUFF** dazu pipettieren (Endvolumen 2,6 ml) und gut mischen.

Durch die drei Flaschen Enzym im Kit ist der ELISA in drei Ansätzen teilbar.

Falls der Kit in einem Ansatz komplett verbraucht werden soll, wird nur ein Fläschchen mit frisch hergestelltem Enzymmix benötigt.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

Es werden je 20 µl Standards, Kontrollen und Urinproben extrahiert.

Es werden je 300 µl Plasmaproben extrahiert.

1. Je 20 µl Standard 1 – 7 **CAL 1 - 7**, je 20 µl Kontrolle 1 & 2 **CON 1 & 2**, je 20 µl Urinprobe in die entsprechende Vertiefung der Extraktionsplatte **EX-PLATE** pipettieren. Zu den Standards, Kontrollen und Urinproben je 250 µl destilliertes Wasser zum Volumenausgleich hinzugeben.
Je 300 µl Plasmaprobe in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren (kein Volumenausgleich erforderlich).

2. Je 50 µl Extraktions-Puffer **EX-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren.
4. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
5. Je 1 ml vorbereiteten Waschpuffer **WASH** in jede Vertiefung pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz inkubieren.
6. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
7. Je 150 µl Acylierungs-Puffer **ACYL-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
8. Je 50 µl Acylierungs-Reagenz **ACYL-REAG** in jede Vertiefung pipettieren und sofort mit Punkt 9. fortfahren.
Bitte beachten: Lösungsmittel reagieren mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Sie reagieren nicht mit Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
9. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren.
10. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
11. Je 1 ml vorbereiteten Waschpuffer **WASH** in alle Vertiefungen pipettieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz inkubieren.
12. Die Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste durch kräftiges Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage (Papierhandtuch) entfernen.
13. Waschvorgang aus Punkt 11 und 12 einmal wiederholen.
14. Je 200 µl Salzsäure **HCL** zur Elution der Catecholamine in jede Vertiefung pipettieren.
15. Platte mit Haftklebefolie **FOIL** abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz inkubieren.

Vorsicht: Überstand anschließend nicht ausleeren!

Vom Überstand werden je 50 µl im Dopamin-ELISA eingesetzt.

7 Testdurchführung ELISA

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

1. Je 20 µl des frisch vorbereiteten Enzymmixes (s. 6.1.2) in jede Vertiefung der Mikrotiterstreifen **STRIPS-DA** pipettieren.
2. Je 50 µl vorbereitete Standards, Kontrollen und Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren. Die entstehenden Rotfärbungen zeigen die bereits pipettierten Vertiefungen an.
3. Platte mit Folie **FOIL** abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren (mittlerer Schüttelfrequenz).
4. Je 50 µl Dopamin-Antiserum (grün) **AS-DA** in jede Vertiefung pipettieren.
5. Platte mit Folie **FOIL** abdecken. Für 10 Sekunden auf dem Horizontalschüttler mischen und 12 – 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren.
6. Vertiefungen entleeren, mit ca. 250 µl vorbereiteten Waschpuffer **WASH** füllen und wieder entleeren. Anschließend die Mikrotiterstreifen umgedreht auf eine saugfähige Unterlage (Papierhandtuch) legen und kurz ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen. Diesen Vorgang insgesamt 4 mal durchführen.
7. Je 100 µl POD-Konjugat **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren (mittlerer Schüttelfrequenz).
9. Waschen: Wie unter Punkt 6. beschrieben.
10. Je 100 µl Substrat **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
11. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf dem Arbeitstisch, mit einer Box abgedeckt, ohne schütteln, inkubieren.
12. Je 100 µl Stopplösung **STOP** in jede Vertiefung pipettieren. 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
13. Streifen innerhalb von 15 Minuten im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) messen.

8 Auswertung

Die OD-Werte der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Es wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen. Alternativ kann auch die Cubic-Spline-Methode oder die Logit-Log-Berechnung verwendet werden.

Die Konzentrationen der Patientenproben können dann direkt aus der Standardkurve in ng/ml abgelesen werden.

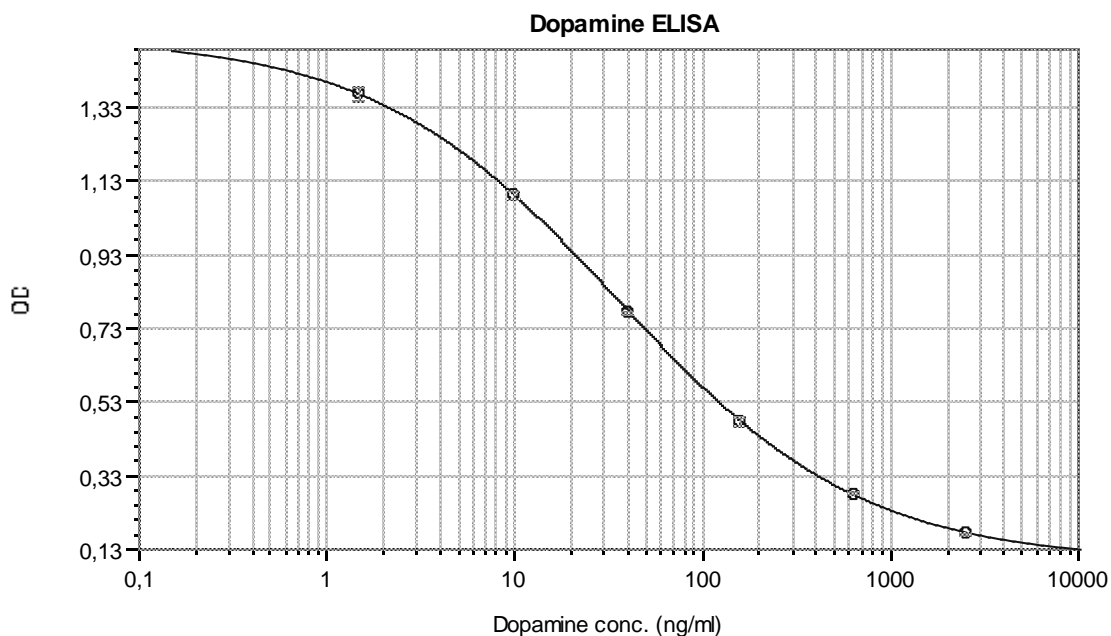
Die abgelesenen Konzentrationen der Urinproben und der Kontrollen können ohne weitere Umrechnung übernommen werden.

Die abgelesenen Konzentrationen der Plasmaproben müssen durch den **Faktor 15 geteilt** werden, da bei der Extraktion 300 µl Plasmaprobe im Verhältnis zu 20 µl Standard eingesetzt werden.

Dopamin: 1ng/ml = 6,53 nmol/l

Qualitätskontrolle: Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn die Kitkontrollen innerhalb der Bereiche entsprechend des Qualitätskontrollzertifikates liegen. Ansonsten sollte der Test wiederholt werden.

Typisches Beispiel (nicht für die Berechnung der Ergebnisse verwenden):



$y = ((A - D) / (1 + (x / C) ^ B)) + D$: A B C D R²
 ○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue) 1,521 0,668 34,936 0,099 1

9 Testcharakteristika

9.1 Referenzbereiche

Die angegebenen Referenzbereiche gelten lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

Matrix	Dopamin
Urin	< 600 µg/Tag
EDTA-Plasma	< 100 pg/ml

9.2 Sensitivität

Matrix	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Urin	0,43 ng/ml	OD _{Cal1} - 2xSD
EDTA-Plasma	29 pg/ml	OD _{Cal1} - 2xSD

9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Kreuzreaktivität (%)
Dopamin	100
Adrenalin	< 0,02
Noradrenalin	0,45
Metanephrin	< 0,01
Normetanephrin	< 0,01
3-Methoxytyramin	< 0,01
L-Dopa	< 0,01
Tyramin	< 0,01
Tyrosin	< 0,002
Homovanillinsäure	< 0,001
Vanillinmandelsäure	< 0,001

9.4 Wiederfindung nach Spiken

Matrix	Bereich (ng/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	136 – 479	92	90 - 96
EDTA-Plasma	0,01 – 17,1	101	91 – 110

9.5 Linearität

Matrix	Bereich (ng/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Urin	48 – 750	1 : 15 mit dest. Wasser	98	95 - 101
EDTA-Plasma	0,45 – 5,86	1 : 15 mit dest. Wasser	107	97 - 115

9.6 Reproduzierbarkeit

Matrix	Bereich (ng/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (ng/ml)	Inter-Assay-Vk
Urin	111 – 426	9,3 – 10,1 %	108 – 400	10,1 – 10,7 %
EDTA-Plasma	0,66 – 5,10	13,0 – 8,2 %		

9.7 Methodenvergleich

Matrix	Vergleichsmethode	Korrelation
Urin	HPLC	$Y = 0,90 \times \text{HPLC} + 24$; $R = 0,982$; $N = 32$

9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit den Referenzbereichen und den Methodenvergleichen (9.7) festgestellt.

9.9 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des Dopamin ELISAs ist im Zusammenhang mit weiteren diagnostischen Verfahren und der Anamnese und der daraus resultierenden Fragestellung zu sehen.

Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden, müssen mit dem entsprechenden Medium (s.9.5) verdünnt und erneut bestimmt werden. Die Werte von verdünnten Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

9.10 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

Nicht angesäuerte Sammelurine nicht verwenden.

10 Änderungen

Version _11: In Abschnitt 4 wurden AS-DA und CONJ um das Gefahrensymbol ergänzt.

Pipettierschema – Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Urin	Plasma
EX-PLATE:					
CAL 1 - 7	µl	20			
CON 1 & 2	µl		20		
Patient Urin	µl			20	
Patient Plasma	µl				300
Dest. Wasser	µl	250	250	250	
EX-BUFF	µl	50	50	50	50

60 Minuten bei RT schütteln
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

WASH	ml	1	1	1	1
------	----	---	---	---	---

5 Minuten bei RT inkubieren (leichtes schütteln)
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

ACYL-BUFF	µl	150	150	150	150
ACYL-REAG	µl	50	50	50	50

Sofort 20 Minuten bei RT schütteln
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

WASH	ml	1	1	1	1
------	----	---	---	---	---

5 Minuten bei RT inkubieren (leichtes schütteln)
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

WASH	ml	1	1	1	1
------	----	---	---	---	---

5 Minuten bei RT inkubieren (leichtes schütteln)
 Platte ausleeren und Flüssigkeitsreste ausklopfen

HCL	µl	200	200	200	200
-----	----	-----	-----	-----	-----

Mit **FOIL** abkleben; 20 Minuten bei RT schütteln
Platte anschließend nicht ausleeren
 Für den ELISA je 50 µl einsetzen

Pipettierschema – ELISA

		Standards	Kontrollen	Proben
STRIPS-DA:				
Enzymmix (frisch)	μl	20	20	20
Von EX-PLATE auf STRIPS-DA übertragen	μl	50	50	50

Mit **FOIL** abkleben, 30 Minuten bei RT mischen

AS-DA (grün)	μl	50	50	50
--------------	----	----	----	----

Platte mit **FOIL** abkleben

10 Sekunden auf dem Horizontalschüttler mischen
12 - 20 Stunden (über Nacht) bei 2 – 8 °C inkubieren

4 x waschen mit 250 μl **WASH** pro Vertiefung

CONJ	μl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei RT schütteln

4 x waschen mit 250 μl **WASH** pro Vertiefung

SUB	μl	100	100	100
-----	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln

30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur abgedeckt (Box), ohne schütteln

STOP	μl	100	100	100
------	----	-----	-----	-----

Platte 10 Sekunden schütteln

Messung der Extinktion bei 450 nm (Ref 570 – 650 nm)