



21-Hydroxylase (21-OH) Autoantibody ELISA Kit - Gebrauchsanweisung



RSR Limited

Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff CF14 5DU United Kingdom

Tel.: +44 29 2068 9299

Fax: +44 29 2075 7770

Email: [info@rsrltd.com](mailto:info@rsrltd.com)

Website: [www.rsrltd.com](http://www.rsrltd.com)



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Flr., Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

VERWENDUNGSZWECK

Das RSR 21-Hydroxylase Autoantibody (21-OH-Ab)-ELISA Kit ist zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen 21-OH (21-OH-Ak) in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt. Die autoimmune Zerstörung der Nebennierenrinde ist die häufigste Ursache von Morbus Addison, und Autoantikörper gegen das adrenal-spezifische Enzym Steroid-21-Hydroxylase sind wichtige Marker für adrenale Autoimmunität. Dies kann der Fall sein, wenn sich die Krankheit als Morbus Addison oder als Teil der autoimmunen polyglandulären Syndrome (APS) Typ I oder Typ II darstellt.

LITERATURLISTE

J. Furmaniak and B. Rees Smith
Editorial: Adrenal and Gonadal Autoimmune Diseases.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995 80: 1502 - 1505
S. Chen et al
Autoantibodies to Steroidogenic Enzymes in Autoimmune Polyglandular Syndrome, Addison's Disease, and Premature Ovarian Failure.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996 81: 1871-1876
H. Tanaka et al
Steroid 21-Hydroxylase Autoantibodies: Measurements with a New Immunoprecipitation Assay.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1997 82: 1440-1446
G. Coco et al
Estimated Risk for Developing Autoimmune Addison's Disease in Patients with Adrenal Cortex Autoantibodies.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006 91: 1637-1645
E. S. Husebye et al
Consensus Statement on the Diagnosis, Treatment and Follow-up of Patients with Primary Adrenal Insufficiency.
J. Intern. Med. 2014 275: 104-115

TESTPRINZIP

Im 21-OH-Ab ELISA Kit von RSR binden 21-OH-Ak in Patientenserum, Referenzpräparaten oder Kalibratoren (optional) und Kontrollen an die mit 21-OH-beschichteten Vertiefungen. Nach einer Inkubation von 16 bis 20 Stunden werden die Überstände verworfen, wobei die an das 21-OH-gebundenen 21-OH-Ak zurückbleiben. In einem 2.





Inkubationsschritt wird 21-OH-Biotin zugegeben, welches von den divalent-wirkenden 21-OH-Ak an das in der Vertiefung beschichtete 21-OH gebunden wird. Anschließend wird in einem 3. Inkubationsschritt durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD), die spezifisch an Biotin bindet, die Menge an gebundenem 21-OH-Biotin bestimmt. Überschüssiges, ungebundenes SA-POD wird dann gewaschen und die Zugabe des Peroxidase-Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) resultiert in der Bildung einer blauen Farbe. Diese Reaktion wird durch die Zugabe einer Stopplösung gestoppt, wodurch sich der Inhalt der Vertiefungen gelb färbt. Die Extinktion der gelben Reaktionsmischung bei 450nm und 405nm wird dann unter Verwendung eines ELISA-Plattenlesegeräts gemessen. Eine höhere Extinktion zeigt das Vorhandensein von 21-OH Ak in der Testprobe an. Das Messen bei 405nm ermöglicht die Quantifizierung hoher Extinktionen. Es wird empfohlen, niedrige Extinktionswerte bei 450nm zu messen. Wenn bei nur einer Wellenlänge gemessen werden kann, können 405nm verwendet werden.

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet werden oder, vorzugsweise in Aliquots, bei ≤ -20°C gelagert werden. 100 µL reichen für einen Assay (Doppelbestimmungen mit je 50 µL). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen in der Lagertemperatur sollten vermieden werden. Lipämische oder hämolytische Serumproben sollten nicht verwendet werden. Kein Plasma verwenden. Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. Das Serum vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise für 5 min bei ca. 10.000 rpm oder ca. 10.000 x g in einer Mikrozentrifuge), um Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt bitte nicht weg, sollten die Seren trüb sein oder Partikel enthalten.

SYMBOLLE

Table with 2 columns: Symbol and Bedeutung. Symbols include CE, IVD, REF, LOT, book icon, factory icon, and sigma icon.

	Ungeöffnet verwendbar bis
	Begrenzung der Lagertemperatur
	Negative Control
	Positive Control

### ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

Pipetten zum Dispensieren von 50 µL und 100 µL.  
Gefäße zum Messen verschiedener Volumina zum Rekonstituieren oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien.

Reinstwasser

ELISA-Plattenleser, geeignet für 96-Well-Formate und in der Lage, bei 450nm und 405nm zu messen.

ELISA-Plattenschüttler mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 rpm (kein Orbitalschüttler).

ELISA-Plattenabdeckung

ELISA-Plattenwaschmaschine

### VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTEN REAGENZIEN

Das ungeöffnete Kit und alle Kitkomponenten (A–N) bei 2-8 °C lagern.

<b>A</b>	<b>21-OH Coated Wells</b> 12 teilbare Streifen mit je 8 Vertiefungen (insgesamt 96) in einem Rahmen und in einem Folienbeutel versiegelt. Folienbeutel vor dem Öffnen 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.
	Stellen Sie sicher, dass die benötigten Vertiefungen fest in den mitgelieferten Rahmen eingepasst sind. Nach dem Öffnen unbenötigte Vertiefungen wieder in den mitgelieferten Original-Folienbeutel mit Trockenmittel geben und mit Kleband verschließen. Den Folienbeutel in den mitgelieferten selbstverschließenden Plastikbeutel legen und bis zu 6 Monate bei 2-8°C lagern.
<b>B</b>	<b>Negative Control</b> 0,7 mL Gebrauchsfertig
<b>C1-2</b>	<b>Positive Controls I &amp; II</b> 2 x 0,7 mL Gebrauchsfertig
<b>D</b>	<b>Reference Preparation</b> 0,7 mL Gebrauchsfertig
<b>E1-4</b>	<b>Calibrators (optional)</b> 0,3; 1,0; 10; 100 u/mL (=E/mL, von RSR willkürlich festgelegte Einheiten) 4 x 0,7 mL Gebrauchsfertig
<b>F</b>	<b>Reaction Enhancer</b> 6 mL, rot gefärbt Gebrauchsfertig
<b>G</b>	<b>21-OH-Biotin</b> 3 Fläschchen Lyophilisiert

	Unmittelbar vor Gebrauch (innerhalb von 30 Minuten) jedes Fläschchen mit 5,5 mL raumtemperatur-warmen Reconstitution Buffer (H) rekonstituieren. Wird mehr als eine Fläschchen benötigt, den Inhalt der Fläschchen poolen und vorsichtig mischen.
<b>H</b>	<b>Reconstitution Buffer for 21-OH-Biotin</b> 2 x 10 mL Gebrauchsfertig
<b>J</b>	<b>Streptavidin Peroxidase (SA-POD)</b> 0,7 mL Konzentrat 1:20 mit Diluent for SA-POD (K) verdünnen. Zum Beispiel 0,5 mL (J) + 9,5 mL (K). Nach dem Verdünnen bis zu 16 Wochen bei 2-8°C lagerbar.
<b>K</b>	<b>Diluent for SA-POD</b> 15 mL Gebrauchsfertig
<b>L</b>	<b>Peroxidase Substrate (TMB)</b> 15 mL Gebrauchsfertig
<b>M</b>	<b>Stop Solution</b> 12 mL Gebrauchsfertig
<b>N</b>	<b>Concentrated Wash Solution</b> 125 mL Konzentrat Vor Gebrauch 1:10 mit Reinstwasser verdünnen. Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagerbar.

### TESTVERFAHREN

An Tag 1 alle für die Schritte 1-3 erforderlichen Reagenzien vor der Verwendung mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen.

An Tag 2 alle für die Schritte 4–13 erforderlichen Reagenzien (mit Ausnahme der 21-OH Coated Wells (A)) vor der Verwendung mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Die 21-OH Coated Wells (A) von Tag 1 solange bei 2-8°C lassen, bis mit Schritt 4 fortgefahren wird. Das 21-OH-Biotin nicht vor Schritt 5 rekonstituieren. Für die Schritte 2, 5, 8, 11 und 12 wird ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipipette®) empfohlen.

<b>Tag 1</b>	<b>1.</b>	Je <b>50 µL</b> (Doppelbestimmung wird empfohlen) der Patientenseren, Negative Control (B), Positive Control (C1–2), Reference Preparation (D) und (falls verwendet) Calibrators (E1–4) in die entsprechenden Vertiefungen der 21-OH Coated Wells (A) pipettieren. Eine Vertiefung leer lassen (= Blank, siehe Schritt 13).
	<b>2.</b>	Je <b>50 µL</b> Reaction Enhancer (F) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.
	<b>3.</b>	Die Vertiefungen abdecken und auf einem ELISA-Plattenschüttler für 1 Minute schütteln (500 rpm). Über Nacht (16-20 Stunden) bei 2-8°C ohne Schütteln inkubieren.

Tag 2	4.	Mit einem ELISA-Plattenwascher die Vertiefungen drei Mal mit verdünnter Wash Solution (N) waschen und absaugen. Wenn kein Plattenwascher verfügbar ist, den Inhalt der Vertiefungen entleeren durch rasches Umdrehen der Vertiefungen über einem geeigneten Behälter, drei Mal manuell waschen und anschließend die Vertiefungen umgedreht auf eine saubere, trockene, saugfähige Oberfläche vorsichtig trockenklappen.
	5.	Das 21-OH-Biotin (G) mit raumtemperatur-warmen Reconstitution Buffer (H) rekonstituieren. Jeweils 100 µL in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.
	6.	Die Vertiefungen abdecken und bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler für 1 Stunde bei 500 rpm schütteln.
	7.	Waschschritt 4 wiederholen.
	8.	Je 100 µL verdünntes SA-POD (J) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren.
	9.	Die Vertiefungen abdecken und bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler für 20 Minuten bei 500 rpm schütteln.
	10.	Waschschritt 4 wiederholen. Beim manuellen Waschen, abschließend einen zusätzlichen Waschschritt mit Reinstwasser durchführen (um eventuellen Schaum zu entfernen), dann erst die Vertiefungen umgedreht trockenklappen.
	11.	Je 100 µL TMB (I) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren und 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubieren.
	12.	Je 50 µL Stop Solution (M) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) pipettieren, den Rahmen abdecken und etwa 5 Sekunden lang auf einem ELISA-Plattenschüttler schütteln. Die Dauer der Substratinkubation sollte bei allen Vertiefungen gleich lang sein.
	13.	Innerhalb von 20 Minuten die Extinktion in jeder Vertiefung bei 450nm und 405nm mit einem ELISA-Plattenlesegerät bestimmen, dabei bei jeder Vertiefung den Wert des Blanks abziehen (Vertiefung mit nur 100 µL TMB (L) und 50 µL Stop Solution (M)).

## TESTAUSWERTUNG

### Ergebnisberechnung ohne Calibrators

#### Indexberechnung

Die Indexwerte werden wie folgt anhand der Absorptiondaten (A) berechnet:

$$\text{Indexwert} = \frac{A_{450\text{nm Probe}}}{A_{450\text{nm Reference Preparation}}} \times 100$$

Der Indexwert kann auch anhand von Absorptionsdaten bei 405nm berechnet werden.

**TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)**

	A450 nm	Index wert	A405 nm	Index wert
Reference Preparation (D)	0,728	100	0,232	100
Negative Control (B)	0,090	12	0,028	12
Positive Control (C1)	0,464	64	0,151	65
Positive Control (C2)	1,684	231	0,541	233

#### ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 45
Positiv	≥ 45

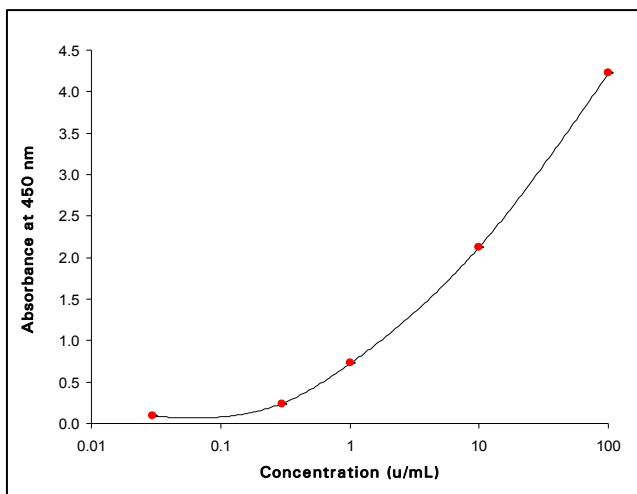
#### Ergebnisberechnung mit Calibrators (optional)

Eine Kalibrierkurve kann erstellt werden, indem die Konzentrationen der Calibrators auf der x-Achse (logarithmische Skala) gegen die Extinktion der Calibrators auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen werden. Die 21-OH-Ak-Konzentrationen in Patientenseren können dann aus der Eichkurve [aufgetragen bei RSR als Spline-Log/Lin-Kurve (Glättungsfaktor = 0)] abgelesen werden. Andere Datenreduktionssysteme können verwendet werden. Der Negative Control (B) kann ein Wert von 0,03 E/mL zugewiesen werden, im Rahmen einer computergestützten Verarbeitung der Testergebnisse.

**TYPISCHE ERGEBNISSE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)**

	A450 nm	Konz E/mL	A405 nm	Konz E/mL
Negative Control (B)	0,090		0,028	
E1	0,231	0,3	0,073	0,3
E2	0,728	1	0,232	1
E3	2,121	10	0,679	10
E4	4,223	100	1,242	100
Positive Control (C1)	0,464	0,57	0,151	0,59
Positive Control (C2)	1,684	5,37	0,541	5,32

Sollten Extinktionswerte bei 450nm über 3,0 liegen, kann der Extinktionswert bei 405nm durch Multiplizieren mit einem entsprechenden Faktor (3,4 im Fall von bei RSR verwendeten Geräten) in 450nm-Extinktionswerte umgewandelt werden.



Proben mit 21-OH-Ak-Konzentrationen über 100 E/mL können mit 21-OH-Ak-negativem Serum verdünnt werden (z. B. 10 x und/oder 100 x). Es kann vorkommen, dass einige Seren sich nicht linear verdünnen.

### ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 0,4 E/mL
Positiv	≥ 0,4 E/mL

Dieser Cut-off wurde bei RSR validiert. Jedoch sollte jedes Labor seinen eigenen normal und pathologische Referenzbereiche für 21-OH-Ak-Spiegel festlegen. Außerdem wird empfohlen, dass jedes Labor sein eigenes Panel an Kontrollproben im Assay mitführt.

### KLINISCHE BEWERTUNG

#### Klinische Spezifität

Seren von 928 gesunden Blutspendern wurden im 21-OH-Ak-ELISA-Kit getestet. 922 (99,4%) Seren wurden als negativ für 21-OH Ak identifiziert. Bei den verbleibenden 6 (0,6%) gesunden Blutspenderseren (0,59; 0,93; 1,2; 2,4; >100 und >100 E/mL) wurde festgestellt, dass sie alle IgM-Antikörper gegen 21-OH enthielten.

#### Klinische Sensitivität

Seren von 100 Patienten mit diagnostiziertem autoimmunem Morbus Addison wurden im 21-OH-Ak-ELISA Kit getestet. 86 (86%) wurden als positiv für 21-OH-Ak identifiziert.

#### Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei 2 Standardabweichungen 0,13 E/mL, der Indexwert 12.

#### Intra-Assay Präzision

Probe	Mittelwert E/mL (n=25)	VK (%)	Mittelwert Index (n=25)	VK (%)
1	0,30	2,7	39	2,2
2	0,89	6,1	92	4,8
3	2,0	6,3	154	3,5
4	5,4	18,1	249	7,3
5	55	9,9	512	2,3

#### Inter-Assay Präzision

Probe	Mittelwert E/mL (n=20)	VK (%)	Mittelwert Index (n=20)	VK (%)
A	0,39	4,1	43	4,9
B	1,0	7,4	102	4,6
C	2,7	17,9	164	8,9
D	10,7	11,5	284	6,2
E	58,7	14,0	500	8,4

### Klinische Genauigkeit

Die Analyse von 185 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als Morbus Addison zeigte keine Interferenz durch Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin, Schilddrüsenperoxidase, TSH-Rezeptor, Glutaminsäuredecarboxylase, Zinktransporter 8, Aquaporin-4, spannungsabhängigen Kaliumkanal, doppelsträngige DNA, Acetylcholinrezeptor oder durch Rheumafaktor. Die Serumprobe eines weiteren Patienten mit Typ-1-DM (GAD-Ak positiv) ergab einen Indexwert von 409 und eine Konzentration von 44 E/mL. Diese Probe wurde mit dem 21-OH-Ak-RIA Kit von RSR getestet und war bei einer 21-OH-Ak-Konzentration von 100 E/mL positiv. Die Serumprobe eines weiteren Patienten mit DM Typ 1 (ZnT8-Ak positiv) ergab einen Indexwert von 60 und eine Konzentration von 0,53 E/mL. Diese Probe wurde im 21-OH-Ak-RIA getestet und war negativ. Eine weitere Probe, die AChRAb-positiv war, ergab einen Indexwert von 68 und eine Konzentration von 0,61 E/mL.

### Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit folgenden Substanzen versetzt wurden: Hämoglobin bei 500 mg/dL, Bilirubin bei 20 mg/dL oder Intralipid bis zu 3000 mg/dL.

### SICHERHEITSHINWEISE

#### Streptavidin Peroxidase (SA-POD) und Reaction Enhancer

**Signalwort:** Achtung



**Gefahrenhinweis(e)**

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

**Sicherheitshinweis(e)**

P261: Einatmen von Nebel / Dampf vermeiden.

P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P280: Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P501: Inhalt / Behälter gemäß lokaler, regionaler, nationaler und / oder internationaler Vorschriften einer Sonderabfall-Sammelstelle zuführen.

## Peroxidase Substrate (TMB)

**Signalwort:** Gefahr

**Gefahrenhinweis(e)**



H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen

**Sicherheitshinweis(e)**

P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P280: Schutzhandschuhe/

Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

P308 + P313: BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P501: Inhalt / Behälter gemäß lokaler, regionaler, nationaler und / oder internationaler Vorschriften einer Sonderabfall-Sammelstelle zuführen.

## Diluent for SA-POD

**Gefahrenhinweis(e)**

EUH208: Enthält 2-Chloracetamid. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Dieses Kit ist nur für den Gebrauch durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfalldaten und die angegebene Haltbarkeit für beschichtete Wells, verdünnte und rekonstituierte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie

im Sicherheitsdatenblatt. Vermeiden Sie alle Handlungen, die wahrscheinlich zu einer Einnahme führen. Kontakt mit Haut und Kleidung vermeiden. Schutzkleidung tragen. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material menschlichen Ursprungs wurde getestet und als nicht reaktiv auf HIV1- und 2- und HCV-Antikörper und HBsAg befunden, sollte aber dennoch als potenziell infektiös behandelt werden. Waschen Sie sich gründlich die Hände, wenn eine Kontamination aufgetreten ist und bevor Sie das Labor verlassen. Sterilisieren Sie alle potenziell kontaminierten Abfälle, einschließlich Testproben, vor der Entsorgung. Das bei der Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, jedoch sollten diese Materialien als potenziell infektiös behandelt werden. Einige Komponenten enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie wie bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren und den Kontakt mit Haut, Augen und Kleidung. Vermeiden Sie die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.

## **ASSAY PLAN**

	Alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25 °C) bringen	
Tag 1	Pipettieren:	<b>50 µL</b> Negative und Positive Controls (B und C1-2), Reference Preparation (D) oder Calibrators (falls verwendet E1-4) und Patientenseren pipettieren (außer Blank)
	Pipettieren:	<b>50 µL</b> Reaction Enhancer (F) (außer Blank)
	Mischen:	Auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm für 1 Minute schütteln
	Inkubieren:	Über Nacht (16-20 Stunden) bei 2-8 °C ohne Schütteln
Tag 2	Aspirieren/Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Tuch trocken Klopfen <sup>1</sup>
	Pipettieren:	<b>100 µL</b> 21-OH-Biotin (G) mit raumtemperatur-warmen Reconstitution Buffer (H) rekonstituiert in jede Vertiefung (außer Blank)
	Inkubieren:	1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
	Aspirieren/Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Tuch trocken Klopfen <sup>1</sup>
	Pipettieren:	<b>100 µL</b> SA-POD (J) (1:20 verdünnt) in jede Vertiefung (außer Blank)
	Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
	Aspirieren/Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen, ein Mal mit Reinstwasser spülen und auf saugfähigem Tuch trocken Klopfen <sup>1</sup>
	Pipettieren:	<b>100 µL</b> TMB (L) in jede Vertiefung (einschließlich Blank)
	Inkubieren:	20 Minuten bei Raumtemperatur <b>im Dunkeln (ohne Schütteln)</b>
	Pipettieren:	<b>50 µL</b> Stop Solution (M) in jede Vertiefung (einschließlich Blank) geben und 5 Sekunden lang schütteln
	Innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Stop Solution die Extinktion bei 450nm und 405nm messen.	
<sup>1</sup> Wenn ein automatischer Plattenwascher verwendet wird, ist es nicht erforderlich, die Platten nach dem Waschen trocken zu klopfen. Ebenso kann der Waschschritt mit Reinstwasser weggelassen werden.		