



Acetylcholine Receptor Autoantibody ELISA Kit - Gebrauchsanweisung



RSR Limited

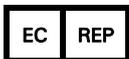
Parc Ty Glas, Llanishen, Cardiff CF14 5DU United Kingdom

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.

ZWECKBESTIMMUNG

Das RSR Acetylcholine Receptor Autoantibody (AChRab) ELISA Kit ist zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen den Acetylcholinrezeptor in Humanserum und nur für die Verwendung durch Fachpersonal bestimmt.

Acetylcholinrezeptor Autoantikörper (AChR-Ak) sind für das Versagen der neuromuskulären Synapse bei Myasthenia gravis verantwortlich. Die Messung dieser Antikörper kann bei der Krankheitsdiagnose und -behandlung von erheblichem Wert sein.

LITERATURLISTE

R. Hewer et al

A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies

Clinica Chimica Acta 2006 **364**: 159 – 166

TESTPRINZIP

Der AChRab ELISA von RSR beruht auf der Fähigkeit der AChR-Ak im Humanserum an ähnliche Stellen auf dem AChR zu binden, wie die verschiedenen monoklonalen Antikörper MAb1 (beschichtet auf den ELISA-Plattenvertiefungen) und/oder MAb2 und/oder MAb3 (die jeweils mit Biotin markiert sind). In Abwesenheit von AChR-Ak bildet sich ein Komplex zwischen MAb1, womit die Plattenvertiefungen beschichtet sind, dem AChR und dem MAb2- und MAb3-Biotin. Gebundenes MAb2- und MAb3-Biotin wird dann durch Zugabe von Streptavidin-Peroxidase (SA-POD), die spezifisch an Biotin bindet, nachgewiesen. Überschüssiges, ungebundenes SA-POD wird dann gewaschen und die Zugabe des Peroxidase-Substrats 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidin (TMB) führt zur Bildung einer blauen Farbe. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung gestoppt, wodurch der Inhalt der Vertiefung gelb wird. Die Extinktion der gelben Reaktionsmischung wird dann unter Verwendung eines ELISA-Plattenlesegeräts bei 450 nm gemessen. In Gegenwart von AChR-Ak wird die Bildung des MAb1-AChR-MAb2-/MAb3-Biotin-Komplexes gehemmt, was zu einer geringeren Bindung von SA-POD und einer niedrigeren Extinktion bei 450 nm führt. Je höher die Konzentration an AChR-Ak im Testserum ist, desto stärker ist die Hemmung der MAb-Biotin-Bindung. Bei Verwendung der Kitkalibratoren beträgt das Messintervall 0,45 – 20 nmol/L gebundenes Toxin.

AUFBEWAHRUNG UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zu analysierende Seren sollten bald nach dem Abseren getestet oder, vorzugsweise in Aliquots, bei ≤ -20°C gelagert werden. 100µL sind ausreichend für einen Assay (Doppelbestimmung mit je 50µL). Wiederholtes Einfrieren, Auftauen oder Erhöhungen

der Lagertemperatur sind zu vermeiden. Lipämische oder hämolytische Seren nicht verwenden. Studien, in denen EDTA-, Citrat- und Heparin-Plasmaproben mit AChR-Ak-positiven Seren versetzt wurden, zeigten geringfügige Unterschiede im Signal im Vergleich zu gespiktem Serum desselben Spenders. Insbesondere OD450-Werte von gespiktem EDTA-, Citrat- und Heparin-Plasma betragen 83% - 122% des gespikten Serums (20 Proben mit Serumkonzentrationen im Bereich von 0,28 nmol/L – 18 nmol/L) oder 69% - 165% bezogen auf nmol/L. Falls erforderlich, Testseren bei Raumtemperatur auftauen lassen und vorsichtig mischen, um ihre Homogenität zu gewährleisten. Die Seren vor dem Assay zentrifugieren (vorzugsweise für 5 min bei 10-15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge), um Partikel zu entfernen. Lassen Sie diesen Zentrifugationsschritt bitte nicht weg, sollten die Seren trüb sein oder Partikel enthalten.

SYMBOLS

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

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Pipetten zum Dispensieren von 25µL, 50µL und 100µL. Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) Gefäße zum Messen verschiedener Volumina, zum Rekonstituieren oder Verdünnen der mitgelieferten Reagenzien. Eppendorf-Röhrchen. Reinstwasser. ELISA-Plattenleser, geeignet für 96-Well-Formate und in der Lage, bei 450 nm zu messen. ELISA-Plattenschüttler mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 500 rpm (kein Orbitalschüttler). ELISA-Plattenabdeckung.

VORBEREITUNG DER MITGELIEFERTERN REAGENZIEN

Ungeöffnete Kits und Komponenten (A – P) bei 2-8°C lagern.

A	<b>AChR MAb1 Coated Wells</b> 12 teilbare Streifen mit je 8 Vertiefungen (insgesamt 96) in einem Rahmen und in einem Folienbeutel versiegelt. Vor dem Öffnen des Folienbeutels mindestens 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 geben und mit Klebeband verschließen. Den Folienbeutel zusammen mit dem Trocknungsmittel in den mitgelieferten selbstverschließenden Plastikbeutel legen und bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum des Kits lagern.
B	<b>Foetal Type AChR</b> 3 Fläschchen Lyophilisiert
	Jedes Fläschchen mit 0,7 mL Reconstitution Buffer for AChR (D) rekonstituieren. Vorsichtig mischen und vor Gebrauch 5 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) stehen lassen. Wenn mehr als ein Fläschchen verwendet wird, die Fläschchen poolen, und dann sofort verwenden, um Adult Type AChR (C) zu rekonstituieren.
C	<b>Adult Type AChR</b> 3 Fläschchen Lyophilisiert
B+C	Jedes Fläschchen (C) mit 0,5 mL rekonstituiertem Foetal Type AChR (B), um eine Mischung aus Foetal und Adult Type AChR (B+C) zu erhalten. Vorsichtig mischen und vor Gebrauch 5 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) stehen lassen. Wenn mehr als ein Fläschchen benötigt wird, die Fläschchen poolen. Bis zu 6 Stunden nach Rekonstitution verwendbar, wenn bei 2-8°C gelagert <sup>1</sup> .
D	<b>Reconstitution Buffer for AChR</b> 5 mL Gebrauchsfertig
E	<b>AChR MAb–Biotin (MAb2 + MAb3)</b> 3 Fläschchen Lyophilisiert
	Jedes Fläschchen mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen Reconstitution Buffer for MAb-Biotin (F) rekonstituieren. Vorsichtig mischen und vor Gebrauch 5 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C) stehen lassen. Wenn mehr als ein Fläschchen benötigt wird, die Fläschchen poolen. Nach Rekonstitution bis zum Verfallsdatum des Kits bei 2-8°C lagern.
F	<b>Reconstitution Buffer for MAb-Biotin</b> 15 mL Gebrauchsfertig
G	<b>Streptavidin Peroxidase (SA-POD)</b> 0,7 mL Konzentrat
	1:20 mit Diluent for SA-POD (H) verdünnen. Zum Beispiel 0,5 mL (G) + 9,5 mL (H). Bis zu 16 Wochen bei 2–8°C lagern.

H	<b>Diluent for SA-POD</b> 15 mL Gebrauchsfertig
J	<b>Peroxidase Substrate (TMB)</b> 15 mL Gebrauchsfertig
K	<b>Stop Solution</b> 10 mL Gebrauchsfertig
L	<b>Concentrated Wash Solution</b> 100 mL Konzentrat
	Vor Gebrauch 10 x mit Reinstwasser verdünnen. Zum Beispiel 100 mL (L) + 900 mL Reinstwasser. Nach Verdünnung bis zum Verfallsdatum des Kits verwenden.
M1-4	<b>Calibrators</b> 0,5; 1,0; 6,5 and 20 nmol/L Toxin gebunden 4 x 0,7 mL Gebrauchsfertig
N	<b>Negative Control</b> 3 mL Gebrauchsfertig
P1-2	<b>Positive Controls I &amp; II</b> (Siehe Etikett für Konzentrationsbereich) 2 x 0,7 mL Gebrauchsfertig

<sup>1</sup>Die Extinktion bei 450 nm ist 10–15% niedriger, wenn rekonstituierte Rezeptoren 6 Stunden lang bei 2–8°C gelagert wurden.

## TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien vor Gebrauch mindestens 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (20-25°C) stehen lassen. Für die Schritte 2, 5, 7, 9 und 10 wird ein Mehrfachdispenser (z. B. Eppendorf Multipette®) empfohlen.

Tag 1	1	Je 100 µL der Proben [Calibrators (M 1-4 – optional), Positive Controls (P 1-2) und Negative Control (N) und Testseren] in einzelne 1,5-mL-Eppendorf-Gefäße, die entsprechend gekennzeichnet sind, pipettieren.
	2	In jedes Eppendorf-Röhrchen (aus Schritt 1) 25 µL der Foetal Type + Adult Type AChR-Mischung (B+C) pipettieren und die Röhrchen verschließen. Stellen Sie sicher, dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden jedes Röhrchens befindet (im Zweifelsfall die Röhrchen 10 Sekunden lang bei 10–15.000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren). Vorsichtig vortexen und über Nacht (16–20 Stunden) bei 2–8°C inkubieren.
Tag 2	3	Jedes Röhrchen der Proben-AChR-Mischung aus Schritt 2 vorsichtig mit einem Vortex-Mischer mischen. Je 50 µL der Probe-AChR-Mischung (Doppelbestimmung wird empfohlen) in die Vertiefungen der AChR MAb1 Coated Wells (A) pipettieren, dabei zwei Vertiefungen leer lassen (= Blank). Die Vertiefungen abdecken und bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) für 1 Stunde inkubieren.

4	Die Vertiefungen mit einer Plattenwaschmaschine absaugen oder durch rasches Umdrehen über einem geeigneten Behälter entleeren. Die Vertiefungen dreimal mit verdünnter Wash Solution (L) waschen. Beim manuellen Waschen die Vertiefungen umgedreht auf eine saubere, trockene, saugfähige Oberfläche vorsichtig trocken Klopfen, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.
5	Je 50 µL rekonstituiertes AChR MAb-Biotin (E) in jede Vertiefung (außer Blank) pipettieren. Die Vertiefungen abdecken und bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) für 1 Stunde inkubieren.
6	Waschschritt 4 wiederholen.
7	Je 100 µL des verdünnten SA-POD (G) in jede Vertiefung (außer Blanks) pipettieren. Die Vertiefungen abdecken und bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler (500 rpm) für 30 Minuten inkubieren.
8	Waschschritt 4 wiederholen. Beim manuellen Waschen abschließend einen zusätzlichen Waschschritt mit Reinstwasser durchführen, um eventuellen Schaum zu entfernen. Die umgedrehten Vertiefungen vorsichtig auf einer sauberen, trockenen, saugfähigen Oberfläche ausklopfen, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.
9	Je 100 µL TMB (J) in jede Vertiefung (einschließlich Blanks) pipettieren. Die Vertiefungen abdecken und im Dunkeln bei Raumtemperatur 30 Minuten lang ohne Schütteln inkubieren.
10	Je 50 µL Stop Solution (K) in jede Vertiefung (einschließlich Blanks) pipettieren, abdecken und ca. 5 Sekunden lang auf einem Plattenschüttler schütteln. Die Dauer der Substratinkubation sollte bei allen Vertiefungen gleich lang sein.
11	Innerhalb von 30 Minuten die Extinktion jeder Vertiefung bei 450 nm mit einem ELISA-Plattenlesegerät bestimmen, dabei bei jeder Vertiefung den Wert der Vertiefungen mit nur 100 µL TMB (J) und 50 µL Stop Solution (K) (Blanks) abziehen.

### TESTAUSWERTUNG

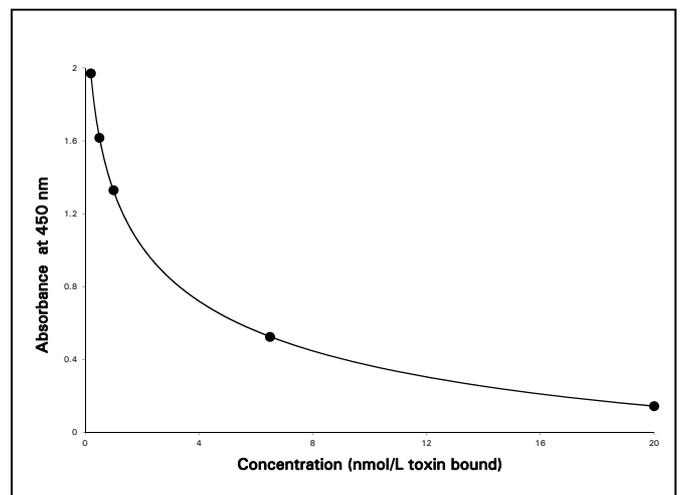
Eine Kalibrationskurve kann erstellt werden, indem die Konzentration der Calibrators (einschließlich eines Werts von 0,2 nmol/L für die Negative Control) auf der x-Achse (lineare Skala) gegen die Extinktion der Calibrators auf der y-Achse (lineare Skala) aufgetragen wird. Aus der Eichkurve können dann die AChR-Ak-Konzentrationen im Patientenserum abgelesen werden. Die Daten in dieser Gebrauchsanweisung basieren auf einer 4-Parameter-Kurvenanpassung. Proben mit hohen AChR-Ak-Konzentrationen können in Negative Control (N) verdünnt werden. Zum Beispiel 10 µL Probe plus 90 µL Negative Control (N), um eine 10x Verdünnung zu erhalten. Andere Verdünnungen (z. B. 100x) können aus einer 10x-Verdünnung oder auf andere Weise nach Bedarf hergestellt werden. Es kann vorkommen,

dass einige Seren sich nicht linear verdünnen, und wir schlagen vor, dass die Verdünnung, die einen Wert ergibt, der einer 50%igen Inhibition am nächsten kommt, zur Berechnung der AChR-Ak-Konzentration verwendet wird.

### TYPISCHE ERGEBNISSE MIT DER STANDARDKURVE (Nur als Beispiel, nicht zur Berechnung der tatsächlichen Ergebnisse verwenden)

Probe	Ext. 450 nm	Konz. nmol/L
Negative Control N	1,970	0,2 <sup>2</sup>
M1	1,616	0,5
M2	1,329	1,0
M3	0,524	6,5
M4	0,144	20
Positive Control P1	0,469	7,5
Positive Control P2	1,124	1,6

<sup>2</sup> Siehe Ergebnisanalyse oben



Die Ergebnisse können auch als Inhibition (% I) der AChR-Bindung ausgedrückt werden, berechnet unter Verwendung der Formel:

$$100 \times \left( 1 - \frac{\text{Extinktion Probe bei 450 nm}}{\text{Extinktion Negative Control (N) bei 450 nm}} \right)$$

Diese prozentuale Inhibition kann dann mit folgender Formel in nmol/L gebundenes Toxin umgewandelt werden;

$$0,2 \times 2^{(0,067 \times \% \text{ Inhibition der Probe})}$$

Diese Formel wurde empirisch aufgestellt durch Vergleichen von AChR-Ak-Messungen mit RSR-ELISA- und RIA-Methoden. Eine hohe Übereinstimmung zwischen den nmol/L-Werten, die im AChRab ELISA unter Verwendung der Kalibrierungskurve und unter Verwendung dieser Formel erhalten wurden, sollte nicht bei allen Einzelseren erwartet werden.

### TYPISCHE ERGEBNISSE MIT % INHIBITION

Probe	Ext. 450 nm	% Inhibition	Kalkuliert nmol/L
Negative Control N	1,970	0	0,2
Positive Control P1	0,469	76,2	6,9
Positive Control P2	1,124	42,9	1,5

### ASSAY CUT-OFF

Negativ	< 0,45 nmol/L
Positiv	≥ 0,45 nmol/L

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

## ASSAY BEWERTUNG

### Klinische Spezifität

Seren von 402 einzelnen gesunden Blutspendern wurden im AChRab ELISA getestet. 401 (99,8%) wurden als AChR-Ak-negativ identifiziert. Eine Probe war positiv und ergab einen Wert von 20% Inhibition (0,54 nmol/L aus der Kalibrierungskurve, 0,52 nmol/L berechnet).

### Klinische Sensitivität

Seren von 83 Patienten, bei denen Myasthenia gravis diagnostiziert wurde, wurden im AChRab ELISA getestet. 76 (92%) wurden als AChR-Ak-positiv identifiziert.

### Untere Nachweisgrenze

Die Negative Control wurde 20 Mal getestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze betrug bei 2 Standardabweichungen 0,25 nmol/L.

### Inter-Assay Präzision (n = 20)

Probe	% Inhibition	VK (%)	nmol/L	VK (%)
1	76,4	3,3	7,7	8,7
2	52,4	6,7	2,0	11,1
3	27,3	9,4	0,62	9,4

### Intra-Assay Präzision (n = 24)

Probe	% Inhibition	VK (%)	nmol/L	VK (%)
4	90,8	0,6	13,5	2,5
5	45,9	2,4	1,7	5,2
6	25,9	7,1	0,67	8,5

### Klinische Genauigkeit

Die Analyse von 107 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen als Myasthenia gravis zeigte keine Interferenz durch Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin (n=10), Schilddrüsenperoxidase (n=11), dsDNA (n=9), TSH-Rezeptor (n=40), Glutaminsäure Decarboxylase (n=10), 21-Hydroxylase (n=10) oder Rheumafaktor (n=27). Zwei weitere Proben ergaben Werte von 28% (0,74 nmol/L) und 44% (1,5 nmol/L) Inhibition und stammten von einem Patienten mit Morbus Basedow (TRAb-positiv) bzw. einem Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (dsDNA-Ak-positiv). Diese Proben wurden mit dem RSR AChRab RIA Kit getestet und waren positiv (Werte von 1,3 bzw. 1,5 nmol/L). Außerdem waren zwei Proben von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Rheumafaktor-positiv) im RSR AChRab ELISA positiv und ergaben Werte von 24% (0,77 nmol/L) und 19% (0,61 nmol/L) Inhibition. Die erste dieser Proben war auch im RSR AChRab RIA positiv (5,3 nmol/L).

### Interferenzen

Es wurde keine Interferenz beobachtet, wenn Proben mit den folgenden Materialien versetzt wurden; Hämoglobin bis 250 mg/dL, Bilirubin 20 mg/dL oder Intralipid bis 3000 mg/dL.

## SICHERHEITSHINWEISE

### Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signalwort: Achtung

Gefahrenhinweis(e)



H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweis(e)

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.

### Peroxidase Substrate (TMB)

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweis(e)



H360: Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen

Sicherheitshinweis(e)

P280: Schutzhandschuhe/

Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

P308 + P313: BEI Exposition oder falls betroffen:

Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

### Diluent for SA-POD

Gefahrenhinweis(e)

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

Dieses Kit ist nur für die In-vitro-Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig. Beachten Sie die auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten und die angegebene Haltbarkeit für beschichtete Wells, verdünnte oder rekonstituierte Reagenzien. Ausführlichere Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt. Vermeiden Sie bei allen Kit-Komponenten das Verschlucken, Einatmen, Injizieren oder den Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung. 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 die Bildung von Schwermetallaziden im Abflusssystem, indem Sie reichlich mit Wasser nachspülen.

## ASSAY PLAN

Tag 1	Lassen Sie alle Reagenzien und Proben vor Gebrauch Raumtemperatur (20-25°C) erreichen	
	Pipettieren:	<b>100 µL</b> , Calibrators (M 1-4 optional), Controls (N und P 1-2), und Serumproben in Eppendorf Röhrchen
	Pipettieren:	<b>25 µL</b> AChR (Foetal Type + Adult Type Mischung B+C) (zentrifugieren falls notwendig) und auf einem Vortex-Mischer mischen
	Inkubieren:	16 – 20 Stunden bei 2–8°C
Tag 2	Pipettieren:	<b>50 µL</b> Probe-AChR-Mischung (in Doppelbestimmung) von jedem Röhrchen in die Vertiefungen (außer Blanks)
	Inkubieren:	1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
	Entleeren:	Vertiefungen Absaugen/Dekantieren
	Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Material trockenklopfen
	Pipettieren:	<b>50 µL</b> AChR MAb-Biotin (E) (rekonstituiert) in jede Vertiefung (außer Blanks)
	Inkubieren:	1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
	Entleeren:	Vertiefungen Absaugen/Dekantieren
	Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und auf saugfähigem Material trockenklopfen
	Pipettieren:	<b>100 µL</b> SA-POD (G) (verdünnt 1:20) in jede Vertiefung (außer Blanks)
	Inkubieren:	30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Plattenschüttler bei 500 rpm
	Entleeren:	Vertiefungen Absaugen/Dekantieren
	Waschen:	Vertiefungen drei Mal waschen und mit Reinstwasser spülen <sup>3</sup> und auf saugfähigem Material trockenklopfen
	Pipettieren:	<b>100 µL</b> TMB (J) in jede Vertiefung (inklusive Blanks)
	Inkubieren:	30 Minuten <b>im Dunkeln</b> bei Raumtemperatur ohne Schütteln
	Pipettieren:	<b>50 µL</b> Stop Solution (K) in jede Vertiefung (inklusive Blanks) und für 5 Sekunden schütteln
Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stop Solution die Extinktion bei 450 nm messen		
<sup>3</sup> Spülschritt mit Reinstwasser weglassen, wenn eine Plattenwaschmaschine verwendet wird.		