




Gebrauchsanweisung


SDMA vet ELISA

Enzymimmunoassay für die
Quantitative Bestimmung von
Endogenem symmetrischen Dimethyl-Arginin (SDMA)
in Serum oder EDTA-Plasma von Hund und Katze

Nur für veterinärmedizinische Diagnostik

REF EA203/96

 12 x 8

 2 – 8 °C







DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Telefon: 040/ 555 87 10 • Fax: 040/ 555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Testprinzip.....	3
2	Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	4
3	Lagerung und Haltbarkeit.....	5
4	Inhalt des Kits.....	5
5	Probengewinnung.....	7
6	Vorbereitung der Proben und Reagenzien	7
7	Testdurchführung.....	9
8	Testauswertung	11
9	Testcharakteristika.....	12
10	Literatur	19
11	Änderungen	19
	Pipettierschema - Probenvorbereitung.....	20
	Pipettierschema - ELISA.....	20

Verwendete Symbole

	Inhalt		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		Temperaturbegrenzung
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Bestellnummer		Gebrauchsanweisung beachten

Gefahrensymbole

	Gefahr		Achtung
---	--------	---	---------

1 Einleitung und Testprinzip

SDMA (symmetrisches Dimethylarginin) identifiziert eine Nierenerkrankung bereits bei einem Verlust der Nierenfunktion von etwa 30-40%. Eine Erhöhung der Kreatininkonzentration tritt erst dann ein, wenn etwa 75% der Nephrone nicht mehr funktionsfähig sind. Somit ist SDMA im Gegensatz zu Kreatinin ein weitaus sensiblerer Biomarker für die Beurteilung der Nierenfunktion bei Hund und Katze. Unser SDMA ELISA ist schnell und präzise. Der für die Routine geeignete Test liefert SDMA-Werte in weniger als 3 Stunden. Er ist damit für die schnelle Diagnose erhöhter SDMA-Spiegel bei der Beurteilung der Nierenfunktion im Serum und Plasma geriatrischer Hunde und Katzen geeignet. SDMA ist immer im Zusammenhang mit Kreatinin und den Ergebnissen der Urinuntersuchung, insbesondere des spezifischen Harngewichts, zu beurteilen.

Erkrankungen der Niere sind bei älteren Hunden und Katzen sehr häufig anzutreffen und haben schwerwiegende gesundheitliche Folgen. Im Laufe des Lebens entwickelt eine von drei Katzen und einer von zehn Hunden eine Nierenerkrankung.

SDMA ist eine methylierte Form der Aminosäure Arginin, die nach Proteolyse eines intranukleären Proteins von allen kernhaltigen Zellen in die Zirkulation freigesetzt wird. Es wird zu mehr als 90% glomerulär filtriert und renal eliminiert. SDMA ist damit spezifisch für die Nierenfunktion. Dabei ist SDMA unabhängig von der Muskelmasse und eignet sich deshalb auch gut für das Monitoring alter und minderbemuskelter Tiere mit chronischer Nierenerkrankung.

Der SDMA-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem SDMA in Plasma und Serum von Hund oder Katze. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei wird SDMA durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-SDMA umgewandelt. Der SDMA-ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. An die Festphase gebundenes und freies, in Lösung befindliches Antigen 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 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 Antigens in der Probe.

2 Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die tierischen Ursprungs sind, stammen von gesunden Tieren. 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 sind zu beachten.
- Beim Handhaben der Reagenzien, Kontrollen und Proben sind die gängigen Laborsicherheitsrichtlinien und die Gute Laborpraxis zu beachten.
- Während der Testdurchführung Kittel, Einmal-Handschuhe und Schutzbrille tragen.
- Ein Teil der Komponenten dieses Testbestecks enthalten Gefahrstoffe und sind kennzeichnungspflichtig. Diese Komponenten tragen das entsprechende Gefahrensymbol auf ihrem Etikett. Weitere Informationen befinden sich in *4. Inhalt des Kits* und auf den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern.
- Kontakt mit einzelnen Reagenzien vermeiden, diese können Reizungen und Verätzungen verursachen.
- Abfälle sollten nach den staatlichen und örtlichen Umweltschutzregularien entsorgt werden.

3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit ist 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. geregelt.

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

4 Inhalt des Kits

Mikrotiterstreifen STRIPS 12 Stück
Je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit SDMA

Standards (1 - 6) CAL 1 - 6 6 Flaschen
Je 4 ml, gebrauchsfertig

Standard	1	2	3	4	5	6
µmol/l	0	0,2	0,4	0,7	1,2	3
ng/ml	0	40	81	141	242	606



Kontrolle 1 & 2 CON 1 & 2 2 Flaschen
Je 4 ml gebrauchsfertig, Bereich: siehe QC Zertifikat

Acylierungsreagenz ACYL-REAG 3 Flaschen
3 ml, lyoph., mit Solvent auflösen

Acylierungspuffer ACYL-BUFF 1 Flasche
3,5 ml, gebrauchsfertig, blau gefärbt



Achtung

Solvent	SOLVENT	2 Flaschen
5 ml gebrauchsfertig, enthält DMSO (bitte beachten: Solvent greift Plastik an; Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen)		 
		Achtung Gefahr
Antiserum	AS	1 Flasche
7 ml, gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-N-AcylSDMA, gelb gefärbt		
Enzymkonjugat	CONJ	1 Flasche
13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen IgG-POD Konjugat		
Waschpuffer	WASH	1 Flasche
20 ml, Konzentrat (50x)		
Substrat	SUB	1 Flasche
13 ml TMB Lösung, gebrauchsfertig		
Stopplösung	STOP	1 Flasche
13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0.3M Schwefelsäure		
Reaktionsplatte	ACYL-PLATE	1 Stück
für die Acylierung		
Ausgleichsreagenz	EQUA-REAG	1 Flasche
Lyoph., mit 21 ml dest. Wasser lösen		
Folie	FOIL	2 Stück
gebrauchsfertig		

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 20, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Rollmischer

5 Probengewinnung

Für den Test kann EDTA-Plasma und Serum eingesetzt werden. Die Proben können bis zu 6 Stunden bei 2 – 8 °C gelagert werden. Proben, die nicht sofort in dem Test eingesetzt werden, können bei -20 °C mindestens 18 Monate gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

6 Vorbereitung der Proben und Reagenzien

6.1 Mikrotiterstreifen

Mikrotiterstreifen **STRIPS** im geschlossenen Folienbeutel in etwa 10 Minuten auf Raumtemperatur bringen. Die nicht benötigten Mikrotiterstreifen dem Halterahmen entnehmen, wieder in den Beutel legen (das Trockenmittel im Beutel belassen) und diesen sorgfältig verschließen.

6.2 Ausgleichsreagenz

Inhalt des Fläschchens **EQUA-REAG** mit 21 ml destilliertem Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Das gelöste Ausgleichsreagenz muss für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden und bleibt so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

6.3 Waschpuffer

Inhalt des Fläschchens **WASH** mit destilliertem Wasser auf 1.000 ml auffüllen, kurz mischen.

Der verdünnte Waschpuffer muss bei 2 – 8 °C gelagert werden und bleibt so für 4 Wochen verwendbar. Für eine Lagerung bis zum Verfallsdatum muss der verdünnte Waschpuffer bei -20 °C eingefroren werden.

6.4 Acylierungs-Reagenz

Inhalt des Fläschchens **ACYL-REAG** mit 3 ml Solvent **SOLVENT** lösen und mindestens 10 Minuten auf den Rollenmischer oder ähnlichem Schüttler mischen. Das Acylierungsreagenz sollte unmittelbar vor Testbeginn frisch angesetzt werden und ist dann mind. 3 Stunden stabil. Durch die 2. und 3. Flasche im Kit ist der ELISA in zwei oder drei Ansätzen teilbar. Wenn der Kit in

einem Ansatz verbraucht wird, den aufgelösten Inhalt von zwei Fläschchen poolen. Nach Gebrauch ist das Restreagenz zu verwerfen.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

7 Testdurchführung

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.

7.1 Probenvorbereitung (Acylierung)

Die für die Acylierung verwendeten Vertiefungen der Reaktionsplatte **ACYL-PLATE** markieren (Edding) und nicht noch einmal verwenden!

1. 20 µl Standard 1 – 6 **CAL 1 - 6**, Kontrolle 1 & 2 **CON 1 & 2**, Plasma und Serum in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte **ACYL-PLATE** pipettieren.
2. 20 µl Acylierungspuffer **ACYL-BUFF** in jede Vertiefung pipettieren.
3. 200 µl gelöstes Ausgleichsreagenz **EQUA-REAG** (s. 6.2) in jede Vertiefung pipettieren.
Platte 10 Sekunden auf einem Horizontalschüttler schütteln.
4. Bitte beachten: Acylierungsreagenz reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschälchen. Acylierungsreagenz reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen.
Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.
50 µl gelöstes Acylierungsreagenz **ACYL-REAG** (frisch, s. 6.4) in jede Vertiefung pipettieren und sofort mit Punkt 5. fortfahren. Farbe wechselt zu violett.
5. 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
20 µl der acylierten Proben im ELISA einsetzen.

7.2 Durchführung ELISA

1. 20 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben von der Reaktionsplatte in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen **STRIPS** pipettieren.
2. 50 µl Antiserum **AS** in jede Vertiefung pipettieren.
3. Platte mit Folie **FOIL** abkleben und 90 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
4. Vertiefungen entleeren, mit ca. 300 µl verdünntem Waschpuffer **WASH** (s. 6.3) pro Vertiefung 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. Alternativ kann auch ein Waschgerät verwendet werden.
5. 100 µl Enzymkonjugat **CONJ** in jede Vertiefung pipettieren.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
7. Waschen: wie unter Punkt 4. beschrieben.
8. 100 µl Substrat in jede Vertiefung pipettieren.
9. 25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (2 – 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
10. 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren, kurz mischen.
11. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 nm und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8 Testauswertung

Standard	1	2	3	4	5	6
µmol/l	0	0,2	0,4	0,7	1,2	3
ng/ml	0	40	81	141	242	606

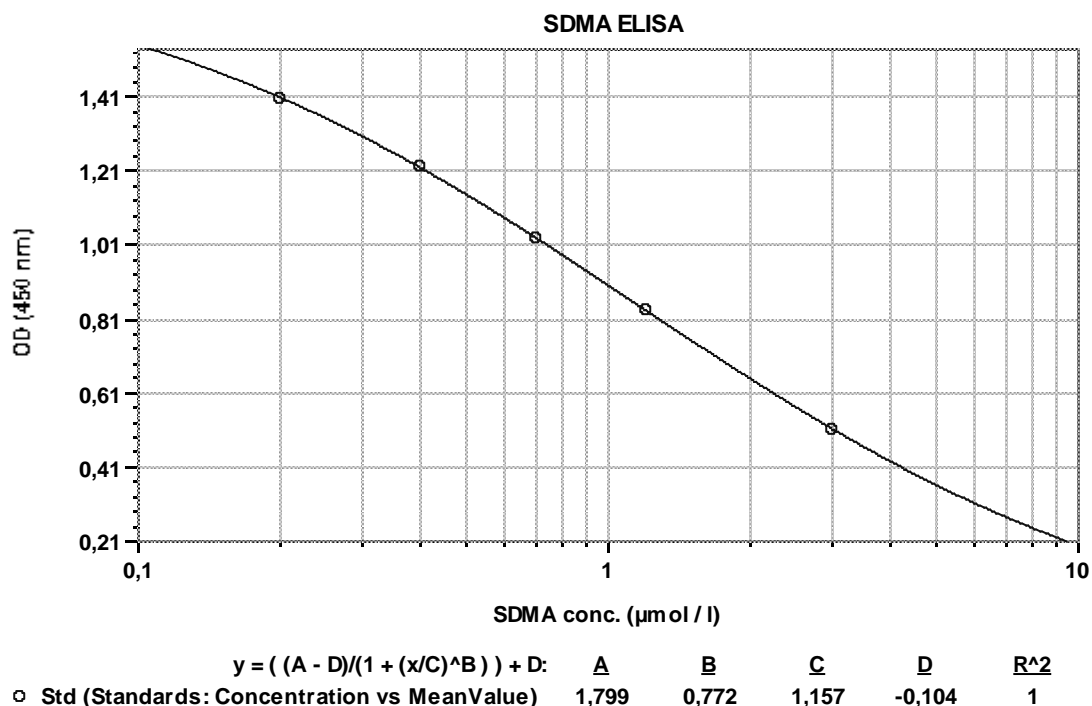
Umrechnung: SDMA: 1 µmol/l = 202 ng/ml = 20,2 µg/dl

Die ODs (optische Dichten) der Standards (linear) werden gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen.

Bei Verwendung eines Computerprogramms wird die 4-Parameter-Analyse empfohlen (Alternativ: Cubic-Spline oder Logit-Log).

Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können direkt aus der Standardkurve in µmol / l abgelesen werden.

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel:



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

9 Testcharakteristika

9.1 Referenzbereiche

Erwartete Werte (Serum, EDTA-Plasma)

Hund: 0,30 – 0,65 $\mu\text{mol/l}$ (6,0 – 13 $\mu\text{g/dl}$)

Katze: 0,30 – 0,75 $\mu\text{mol/l}$ (6,0 – 15 $\mu\text{g/dl}$)

Der angegebene Referenzbereich gilt lediglich als Richtlinie. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche erstellt.

9.2 Sensitivität

0,03 $\mu\text{mol/l}$ (0,6 $\mu\text{g/dl}$)

9.3 Wiederfindung

9.3.1 Wiederfindung Katze

Unterschiedliche Mengen an SDMA wurden zu einem Serumpool von Katzen gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von SDMA wurde bei 10 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 101 %.

zugesezt [$\mu\text{mol/l}$]	gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	% Wiederfindung
0,00	0,58		
0,12	0,68	0,70	97
0,24	0,77	0,82	91
0,35	0,86	0,93	92
0,45	0,91	1,03	88
0,55	0,99	1,13	88
0,65	1,24	1,23	101
0,77	1,71	1,35	127
1,04	1,90	1,62	117
1,35	1,95	1,93	101
1,65	2,29	2,23	103

Mittelwert

101

9.3.2 Wiederfindung Hund

Unterschiedliche Mengen an SDMA wurden zu einem Serumpool von Hunden gegeben und anschließend im ELISA gemessen. Die analytische Wiederfindung von SDMA wurde bei 10 verschiedenen Konzentrationen aus den theoretisch erwarteten und den praktisch gemessenen Werten ermittelt. Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen der Serumprobe betrug 104 %.

zugesetzt [$\mu\text{mol/l}$]	gemessen [$\mu\text{mol/l}$]	erwartet [$\mu\text{mol/l}$]	% Wiederfindung
0,00	0,54		
0,12	0,74	0,66	112
0,24	0,74	0,78	95
0,35	0,86	0,89	97
0,45	0,94	0,99	95
0,55	1,01	1,09	93
0,65	1,19	1,18	101
0,77	1,51	1,31	115
1,04	1,73	1,58	109
1,35	2,19	1,89	116
1,65	2,23	2,19	102
Mittelwert			104

9.4 Linearität

9.4.1 Linearität Katze

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe von der Katze mit Wasser bestimmt. Die mittlere Linearität aller 7 Verdünnungen betrug in der Serumprobe 96%.

Verdünnung	Messwert [$\mu\text{mol/l}$]	extrapolierter Ausgangswert [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung %
orig.	2,09		
4 + 1	1,73	2,16	103
2 + 1	1,30	1,95	93
1 + 1	0,95	1,90	91
1 + 2	0,59	1,77	85
1 + 3	0,52	2,08	100
1 + 5	0,33	1,98	95
1 + 7	0,28	2,24	107

mittlere Wiederfindung 96

9.4.2 Linearität Hund

Die Linearität des ELISAs wurde durch Verdünnen einer aufgestockten Serumprobe vom Hund mit Wasser bestimmt. Die mittlere Linearität aller 7 Verdünnungen betrug in der Serumprobe 92%.

Verdünnung	Messwert [$\mu\text{mol/l}$]	extrapolierter Ausgangswert [$\mu\text{mol/l}$]	Wiederfindung %
orig.	1,88		
4 + 1	1,30	1,63	87
2 + 1	1,21	1,82	97
1 + 1	0,92	1,84	98
1 + 2	0,59	1,77	94
1 + 3	0,43	1,72	91
1 + 5	0,28	1,68	89
1 + 7	0,20	1,60	85

mittlere Wiederfindung 92

9.5 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Der in dem Test verwendete Antikörper ist spezifisch für SDMA. Getestet wurden die Kreuzreaktivitäten zu Arginin, Homoarginin, Monomethylarginin (NMMA) und ADMA.

Substanz	ED-50-Wert [$\mu\text{mol/l}$]	Kreuzreaktivität [%]
SDMA	1,39	100
ADMA	84	1,2
NMMA	182	0,76
Homoarginin	2807	0,05
Arginin	8574	0,016

9.6 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der ELISA-Methode wurde durch die Ermittlung der Intra- Assay- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten gezeigt (Konzentrationsangaben in $\mu\text{mol/l}$):

9.6.1 Intra-Assay Katze

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK [%]
K1	40	0,837	0,064	7,6
K2	40	0,862	0,049	5,7
K3	40	0,770	0,058	7,7

9.6.2 Intra-Assay Hund

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK [%]
H1	40	0,531	0,061	11,5
H2	40	0,804	0,068	8,5
H3	40	0,776	0,046	5,9

9.6.3 Inter-Assay Katze

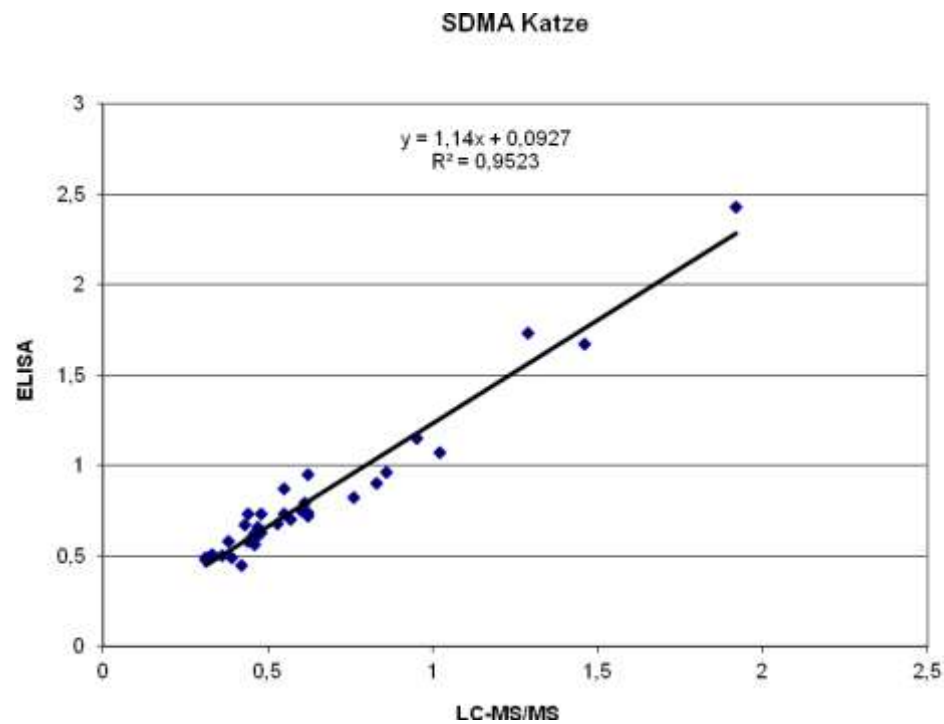
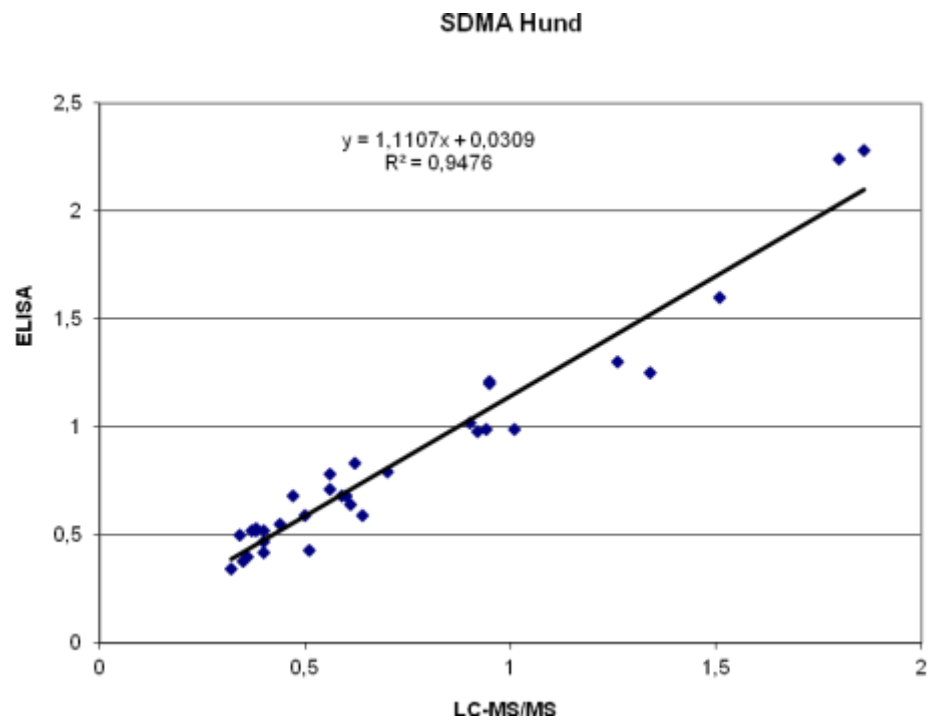
Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
K1	32	0,49	0,037	7,5
K2	32	0,59	0,043	7,3
K3	32	0,72	0,079	11,0
K4	32	0,74	0,058	7,8
K5	32	0,84	0,068	8,1
K6	32	0,84	0,982	9,7

9.6.4 Inter-Assay Hund

Probe	Anzahl n	Mittelwert	SD	VK (%)
H1	32	0,49	0,042	8,5
H2	32	0,66	0,046	7,0
H3	32	0,76	0,063	8,2
H4	32	0,93	0,069	7,4
H5	32	1,21	0,128	10,6
H6	32	1,35	0,152	11,3

9.7 Methodenvergleich

Korrelation ELISA zur LC-MS/MS Methode



9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch Einwaage der Reinsubstanz. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit dem Referenzbereich (9.1) und dem Methodenvergleich (9.7) festgestellt.

9.9 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des SDMA 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 Wasser (s. 9.4) verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.10 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10 Literatur

- Josipa Kuleš, Petra Bilić, Blanka Beer Ljubić, Jelena Gotić, Martina Crnogaj, Mirna Brkljačić, Vladimir Mrljak
Glomerular and tubular kidney damage markers in canine babesiosis caused by Babesia canis
Ticks and Tick-borne Diseases (2018) 9 1508 - 1517
- Bode-Böger S.M., Scalera F., Kielstein J.T., Martens-Lobenhoffer J., Breithardt G., Fobker M., Reinecke H.
Symmetrical Dimethylarginine: A new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease
J. Am. Soc. Nephrol. (2006) 17: 1128-1134
- Kielstein J.T., Salpeter S.R., Bode-Böger S.M., Cooke J.P., Fliser D.
Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta-analysis
Nephrol. Dial. Transplant (2006) 21: 2446 – 2451

11 Änderungen

Version _12: In Abschnitt 4 wurde das Gefahrensymbol „Achtung“ beim POD Konjugat entfernt, da nicht mehr notwendig.

Version _11: Die Arbeitsanleitung wurde neu formatiert. Abschnitt 7 und Pipettierschemata wurden um die Komponentenbezeichnung laut Etikett ergänzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Es wurden keine Änderungen an den Komponenten oder an der Durchführung vorgenommen.

Pipettierschema - Probenvorbereitung

		Standards	Kontrollen	Proben
ACYL-PLATE:				
CAL 1 - 6	µl	20		
CON 1 & 2	µl		20	
Probe	µl			20
ACYL-BUFF	µl	20	20	20
gelöst. EQUA-REAG	µl	200	200	200

Platte 10 Sekunden schütteln

gelöst. ACYL-REAG, frisch	µl	50	50	50
---------------------------	----	----	----	----

Sofort 20 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
20 µl im ELISA einsetzen

Pipettierschema - ELISA

		Acyl. Standards	Acyl. Kontrollen	Acyl. Proben
STRIPS:				
Übertragung von ACYL-PLATE in STRIPS	µl	20	20	20
AS	µl	50	50	50

Platte mit FOIL abkleben

90 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
4 x Waschen (ca. 300 µl WASH pro Vertiefung)

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

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln
4 x Waschen (ca. 300 µl WASH pro Vertiefung)

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

25 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

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

Messung der Extinktion bei 450 nm