



Arbeitsanleitung

Nor-/ Metanephrin in Plasma ELISA

Enzymimmunoassay
für die quantitative Bestimmung von
freiem
Normetanephrin und Metanephrin
in Plasma



REF EA612/192

 2 x 96

 2 – 8 °C

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH
Adlerhorst 15 • 22459 Hamburg • Telephone: +49-40-555 87 10 • Fax: +49-40-555 87 111
Internet: <http://www.dld-diagnostika.de> • E-Mail: contact@dld-diagnostika.de

1. Einleitung und Testprinzip

Normetanephrin und Metanephrin sind physiologische Abbauprodukte der Catecholamine, aus denen sie durch das Enzym Catechol-O-methyltransferase (COMT) gebildet werden. Sie werden in erhöhten Konzentrationen beim Phäochromozytom, Ganglioneurom und verwandten Tumoren neurogenen Ursprungs gefunden.

Der Nor-/Metanephrin-ELISA-Kit enthält Reagenzien für die quantitative Bestimmung von derivatisiertem Metanephrin und Normetanephrin in humanem Plasma. Durch Fällungsreagenzien werden die Proteine aus dem Plasma von dem Metanephrin und Normetanephrin getrennt. Die Derivatisierung erfolgt während der Probenvorbereitung. Dabei werden Metanephrin und Normetanephrin durch das Acylierungsreagenz quantitativ in N-Acyl-Metanephrin und N-Acyl-Normetanephrin umgewandelt.

Der Nor-/Metanephrin-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 Waschschritt 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 zur in vitro Diagnostik. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
- Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg, HCV bzw. HIV I/II-Antikörper ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- 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 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.
- 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 Testbestecks* 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.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Laboratorium bezüglich des Mitführens von Kontrollproben und/oder Poolproben, sollten beachtet 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 6.1 geregelt.

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

4. Inhalt des Testbestecks

4.1	Mikrotiterstreifen 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar, beschichtet mit Metanephrin oder Normetanephrin	STRIPS-MN STRIPS-NMN	2 x 12 Stück
4.2	Standards 1 - 6 1,5 ml, lyophilisiert; Konzentration: Siehe Q.C.-Zertifikat 2 x Standard 1 zur Verdünnung erhöhter Proben	CAL 1 - 6	7 Fläschchen
4.3	Kontrolle 1 & 2 1,5 ml, lyophilisiert; Bereich: Siehe Q.C.-Zertifikat	CON 1 & 2	2 Fläschchen
4.4	Acylierungspuffer 6 ml, gebrauchsfertig, reizend	ACYL-BUFF	 1 Fläschchen
4.5	Acylierungsreagenz 2,5 ml, lyophilisiert, mit Solvent auflösen	ACYL-REAG	3 Fläschchen
4.6	Metanephrin-Antiserum 0,45 ml, Konzentrat, blau gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-Metanephrin	AS-MN	1 Fläschchen
4.7	Normetanephrin-Antiserum 4 ml, gebrauchsfertig, gelb gefärbt, Kaninchen-anti-N-Acyl-Normetanephrin	AS-NMN	1 Fläschchen
4.8	Enzymkonjugat 13 ml, gebrauchsfertig, Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase	CONJ	2 Fläschchen
4.9	Waschpuffer 20 ml, Konzentrat (50x)	WASH	2 Fläschchen
4.10	Substrat 13 ml TMB-Lösung, gebrauchsfertig	SUB	2 Fläschchen

4.11	Stopplösung 13 ml, gebrauchsfertig, enthält 0,3 M Schwefelsäure	STOP		2 Fläschchen
4.12	Präzipitationsröhrchen für die Fällung	PRECI-TUBE		100 Stück
4.13	Präzipitator 1 3,5 ml, gebrauchsfertig, reizend	PRECI 1		1 Fläschchen
4.14	Präzipitator 2 3,5 ml, gebrauchsfertig, reizend	PRECI 2		1 Fläschchen
4.15	Solvent 5,5 ml, gebrauchsfertig, enthält Aceton, reizend, leicht entzündlich	SOLVENT	 	2 Fläschchen
4.16	Folie gebrauchsfertig	FOIL		4 Stück

Weiter werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Pipetten für 25, 40, 50, 100 und 200 µl
- Mehrkanalpipette oder Waschgerät
- Multipette
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer (450 nm)
- Horizontalschüttler
- Zentrifuge (4000xg)

5. Probengewinnung

Plasma

Für den Test sollte nur EDTA-Plasma eingesetzt werden.

Medikamente, Sucht- und Genussmittel, sowie Stress beeinflussen die Katecholamin-Ausschüttung und können beim Metanephrin und Normetanephrin zu falsch positiven Befunden führen.

Medikamente (z.B. L-Dopa, Alpha-Blocker, Antidepressiva, MAO-Hemmer usw.) wenn medizinisch vertretbar, sollten ca. 5 Tage vor der Blutentnahme abgesetzt werden.

Mindestens 4-stündige Nahrungskarenz, kein Tee, Kaffee, Alkohol, Nikotin oder andere Genussmittel und keine stärkere körperliche Betätigung.

Es empfiehlt sich, dass der Patient mit liegender Kanüle ruht und die Blutentnahme erst 20 - 30 Minuten nach Venenpunktion erfolgt.

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 12 Monate gelagert werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben sollte vermieden werden.

6. Vorbereitung der Reagenzien und Proben

6.1 Vorbereitung der Reagenzien

Standards und Kontrollen

CAL 1 – 6

CON 1 & 2

Inhalt des Fläschchens mit 1,5 ml dest. Wasser lösen, kurz vortexen und mindestens 20 Minuten auf den Rollenmischer oder ähnlichem Schüttler mischen, übermäßige Schaumbildung vermeiden.

Die aufgelösten Standards und Kontrollen müssen für den späteren Gebrauch bei – 20 °C eingefroren werden und bleiben so bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Acylierungs-Reagenz

ACYL-REAG

Inhalt des Fläschchens mit 2,5 ml Solvent lösen und mindestens 15 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.

MN Antiserum

AS-MN

Konzentrat, muss 1 + 9 mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Nur soviel ansetzen wie benötigt wird, verdünntes Antiserum ist nur einen Tag stabil.

Waschpuffer

WASH

Inhalt des Fläschchens mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, kurz mischen. Der verdünnte Waschpuffer muss für den späteren Gebrauch 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.

Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.

6.2 Probenvorbereitung (Präzipitation und Acylierung)

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

1. **200 µl der aufgelösten Standards, Kontrollen und Proben** in entsprechend beschrifteten **Präzipitationsröhrchen** pipettieren.
2. **25 µl Präzipitator 1** in alle Röhrchen pipettieren.
3. **25 µl Präzipitator 2** in alle Röhrchen pipettieren.
4. Röhrchen kräftig mischen (Vortex).
5. Röhrchen 15 Minuten bei mind. 4.000 x g zentrifugieren, möglichst Zentrifuge mit Ausschwing-Rotor.
Achtung: 4.000 x g sind nicht unbedingt 4.000 rpm (round per minute) und muss für jede Zentrifuge eingestellt werden.
6. **50 µl Acylierungspuffer** in alle Röhrchen pipettieren und sofort mit 7. fortfahren.

7. Bitte beachten: Solvent reagiert mit vielen Plastikmaterialien, z.B. Plastikschrälchen. Solvent reagiert nicht mit normalen Pipettenspitzen und Glasgefäßen. Solvent ist leicht flüchtig und verdampft schnell. Daher bitte keine Gefäße zusammen mit Mehrkanalpipetten verwenden, da sie eine hohe Oberfläche besitzen.

Bitte Multipetten oder Ähnliches verwenden, das gelöste Acylierungsreagenz direkt aus dem Fläschchen aufziehen und pipettieren.

40 µl gelöstes Acylierungsreagenz in jedes einzelne Rörchen pipettieren und sofort jedes Rörchen einzeln leicht, ca. 2 bis 4 Sekunden vortexen (mittlere Vortexgeschwindigkeit), dann erst mit dem nächsten Rörchen fortfahren.

Der Bodensatz darf nicht aufgewirbelt werden. Rotfärbung entsteht.

8. Rörchen 15 Minuten bei mind. 4.000 x g zentrifugieren, möglichst Zentrifuge mit Ausschwing-Rotor.

Jeweils 50 µl werden im Metanephrin- und Normetanephrin ELISA eingesetzt.

7. Testdurchführung

7.1

Metanephrin- ELISA

1. **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Metanephrin Mikrotiterstreifen (blau) pipettieren.
2. 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte **offen** schütteln.
3. **25 µl Metanephrin-Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren, Blaufärbung entsteht.
4. Platte mit Folie abkleben und 2 Stunden bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** 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.
6. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
7. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
8. Waschen: Wie unter Punkt 5. beschrieben.
9. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
10. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
11. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
12. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

Normetanephrin- ELISA

1. **50 µl acylierte Standards, Kontrollen und Proben** in die entsprechenden Vertiefungen der Normetanephrin Mikrotiterstreifen (gelb) pipettieren.
2. 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
Platte **nicht** abkleben oder zudeckeln, Platte **offen** schütteln.
3. **25 µl Normetanephrin-Antiserum** in alle Vertiefungen pipettieren, Orangefärbung entsteht.
4. Platte mit Folie abkleben und 2 Stunden bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
5. Vertiefungen entleeren, mit ca. **300 µl verdünntem Waschpuffer** 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.
6. **100 µl Enzymkonjugat** in alle Vertiefungen pipettieren.
7. 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
8. Waschen: Wie unter Punkt 5. beschrieben.
9. **100 µl Substrat** in alle Vertiefungen pipettieren.
10. 30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) auf einem Horizontalschüttler bei mittlerer Schüttelfrequenz mischen.
11. **100 µl Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettieren, kurz mischen.
12. Platte im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge zwischen 570 und 650 nm) innerhalb von 15 Minuten messen.

8. Auswertung und Beurteilung

Die Konzentrationen der Standards: Siehe Q.C.-Zertifikat.

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 Proben können direkt aus der Standardkurve in pg / ml abgelesen werden.

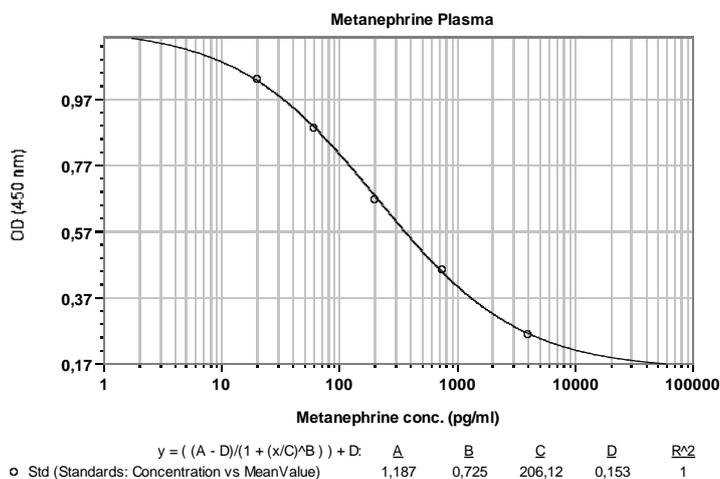
Umrechnung:

Metanephrin: 1 pg / ml = 5,07 pmol / l

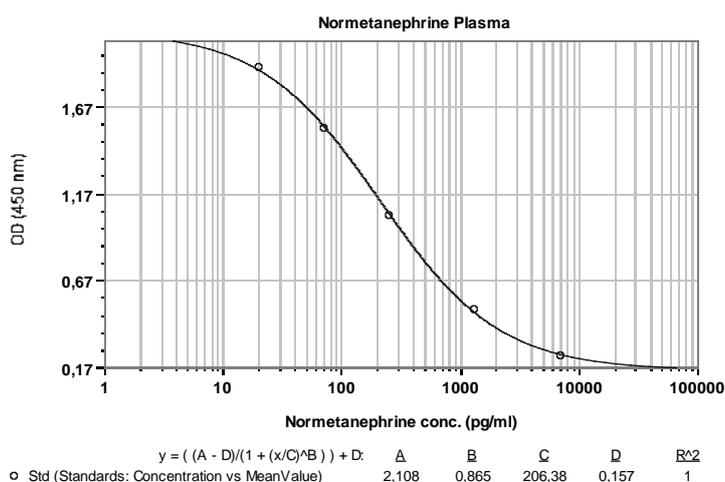
Normetanephrin: 1 pg / ml = 5,46 pmol / l

Die Abbildungen zeigen typische Beispiele:

Metanephrin Plasma ELISA:



Normetanephrin Plasma ELISA:



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

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

Metanephrin	Normetanephrin
< 90 pg/ml	< 190 pg/ml

9.2 Sensitivität

	Untere Nachweisgrenze	Berechnung
Metanephrin	< 7 pg/ml	$OD_{Cal1} - 2xSD$
Normetanephrin	< 7 pg/ml	$OD_{Cal1} - 2xSD$

9.3 Spezifität (Kreuzreaktivitäten)

Substanz	Metanephrin (%)	Normetanephrin (%)
Metanephrin	100	0,015
Normetanephrin	0,130	100
3-Methoxytyramin	0,003	0,076
Adrenalin	0,039	0,0003
Noradrenalin	0,0008	0,0030
Tyramin	0,0005	0,0043
Dopamin	< 0,0001	0,0006
Homovanilinsäure	< 0,0001	< 0,0001
Vanilinmandelsäure	< 0,0001	< 0,0001
L-Dopa	< 0,0001	< 0,0001
L-Tyrosin	< 0,0001	< 0,0001

9.4 Wiederfindung nach Spiken

	Bereich (pg/ml)	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Metanephrin	20 - 900	94	82 - 117
Normetanephrin	34 - 1633	96	90 - 108

9.5 Linearität (Wiederfindung nach Verdünnung mit Standard 1)

	Bereich (pg/ml)	Höchste Verd.	Mittelwert (%)	Bereich (%)
Metanephrin	43 - 886	1 : 20	103	96 - 112
Normetanephrin	70 - 1613	1 : 20	93	86 - 105

9.6 Reproduzierbarkeit

	Bereich (pg/ml)	Intra-Assay-Vk	Bereich (pg/ml)	Inter-Assay-Vk
Metanephrin	157 - 403	7,9 - 7,8 %	118 - 276	8,8 - 8,6 %
Normetanephrin	193 - 757	8,4 - 4,1 %	246 - 551	9,3 - 9,2 %

9.7 Methodenvergleich

	Vergleichsmethode	Korrelation
Metanephrin	LC/MS	$Y = 1,04 \times LC/MS - 23$; $R = 0,991$; $N = 32$
Normetanephrin	LC/MS	$Y = 0,99 \times LC/MS - 8$; $R = 0,984$; $N = 32$

9.8 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt durch die Zugabe einer definierten Metanephrin- und Normetanephrin Stammlösung. Die Richtigkeit der Methode wurde durch den Vergleich mit den Referenzbereichen (9.1) und den Methodenvergleichen (9.7) festgestellt.

9.9 Grenzen der Methode

Das Ergebnis des Nor-/Metanephrin Elisa 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 Standard 1 verdünnt und erneut bestimmt werden.

9.10 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben sollten nicht eingesetzt werden.

10. Literatur

- Unger, N.; Pitt, C.; Petersenn, S.; et al. (2006):
Diagnostic value of various biochemical parameters for the diagnosis of pheochromocytoma in patients with adrenal mass
European Journal of Endocrinology 154 409–417
- Eisenhofer, G.; Walther, M.; Keiser, H.; et al. (2000):
Plasma metanephrines: a novel and costeffective test for pheochromocytoma
Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33: 1157-1169
- Bravo, E. (2004):
Pheochromocytoma: Current Perspectives in the Pathogenesis, Diagnosis, and Management
Arq Bras Endocrinol Metab 48/5:746-750
- Candito, M.; Billaud, E.; Chauffert, M.; et al. (2002):
Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and neuroblastomas
Ann Biol Clin (Paris). 2002 Jan-Feb;60(1):15-36.
- Lenders, J.; Pacak, K.; McClellan, M.; et al. (2002)::
Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma Which Test Is Best?
Jama, March 20, 2002-Vol 287, No. 11
- Eisenhofer, G.; Keiser, H.; Friberg, P.; et al. (1998):
Plasma Metanephrines Are Markers of Pheochromocytoma Produced by Catechol-O-Methyltransferase Within Tumors
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Vol. 83, No. 6
- Lenders, J.; Keiser, H.; Goldstein, D.; et al. (1995):
Plasma Metanephrines in the Diagnosis of Pheochromocytoma
Annals of Internal Medicine • Volume 123 • Number 2

11. Verwendete Symbole

 In-Vitro-Diagnostikum

 Inhalt

 Chargenbezeichnung

 Hersteller

 Bestellnummer

 CE markiert

 Verwendbar bis

 Temperaturbegrenzung

 Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

 Gebrauchsanweisung beachten

Pipettierschema Probenvorbereitung (Metanephrin und Normetanephrin)

	Standard	Kontrolle	Plasma
Standard 1 - 6 μl	200		
Kontrolle 1 & 2 μl		200	
Plasma μl			200
Präzipitator 1 μl	25	25	25
Präzipitator 2 μl	25	25	25

Kräftig vortexen

15 Minuten bei 4.000 x g zentrifugieren

Acyl. Puffer μl	50	50	50
Acyl. Reagenz μl	40	40	40

Acylierungsreagenz einzeln zugeben und einzeln sofort leicht vortexen,
dann erst mit dem nächsten Röhrchen fortfahren

15 Minuten bei 4.000 x g zentrifugieren

50 μl im jeweiligen ELISA einsetzen

Pipettierschema Metanephrin ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	µl	50		
Acyl. Kontrolle	µl		50	
Acyl. Probe	µl			50

1 Stunde bei Raumtemperatur **offen** schütteln

Metanephrin Antiserum	µl	25	25	25
------------------------------	----	----	----	----

Platte mit Folie abkleben

2 Stunden bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat	µl	100	100	100
----------------------	----	-----	-----	-----

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat	µl	100	100	100
-----------------	----	-----	-----	-----

30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung	µl	100	100	100
--------------------	----	-----	-----	-----

Messung der Extinktion bei 450 nm

Pipettierschema Normetanephrin ELISA

		Standard	Kontrolle	Probe
Acyl. Standard	μl	50		
Acyl. Kontrolle	μl		50	
Acyl. Probe	μl			50

1 Stunde bei Raumtemperatur **offen** schütteln

Normetanephrin		25	25	25
Antiserum	μl			

Platte mit Folie abkleben

2 Stunden bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Enzymkonjugat		100	100	100
	μl			

30 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

4 x Waschen

Substrat		100	100	100
	μl			

30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur schütteln

Stopplösung		100	100	100
	μl			

Messung der Extinktion bei 450 nm