

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙРОН-СПЕЦИФИЧНОЙ ЭНОЛАЗЫ (НСЕ)

420-10, Can Ag NSE EIA

Каталог. № : 420-10

Методика от 07-2013

Количество : 96

Производитель: Fujirebio Diagnostics, Inc., (Швеция)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор CanAg NSE EIA предназначен для количественного определения нейрон-специфичной энолазы (НСЕ) в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ МЕТОДА

Гликолитическая ферментная энолаза (2-фосфо-D-глицерато гидролиаза, ЕС 4.2.1.11) существует в виде нескольких димерных изоферментов ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$ и $\gamma\gamma$) образованных из трех субъединиц α , β и γ . γ -единица обнаружена или в гомологических $\gamma\gamma$ - или в гетерологических $\alpha\gamma$ -изоферментах и известна как нейрон-специфическая энолаза (НСЕ). Моноклональные антитела, используемые в данном наборе, связаны с γ -субъединицей фермента и, следовательно, детектируют и $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы (1,2). Уровни НСЕ низки у здоровых людей и пациентов с доброкачественными заболеваниями. Повышенные уровни обычно обнаруживаются у пациентов с нейроэндокринными опухолями, особенно с мелкоклеточным раком легких (3) и нейроblastомой (4). Количественное определение НСЕ в сыворотке важно для пациентов с подозрением на мелкоклеточный рак легких или нейроblastому для подтверждения диагноза, мониторинга эффективности лечения и обнаружения рецидивов болезни.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор является твердофазным, неконкурентным методом, основанным на использовании двух типов моноклональных мышиных антител, направленных против двух различных антигенных детерминант в молекуле НСЕ. Используемые моноклональные антитела связываются с γ -субъединицей фермента и следовательно, детектируют и $\gamma\gamma$ и $\alpha\gamma$ формы. Стандарты и сыворотки пациентов инкубируются вместе с биотинилированными анти-НСЕ антителами MAб E21 и моноклональными антителами E17, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент (перекись водорода и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), в результате происходит ферментативная реакция. В процессе реакции развивается голубая окраска, если присутствует антиген. Интенсивность окраски пропорциональна количеству НСЕ, присутствующей в образце. Интенсивность окраски измеряется на микропланшетном ридере при 620 нм (или опционально, при 405 нм после добавления стоп-раствора).

Стандартные кривые строятся для каждого анализа в координатах оптическая плотность против концентрации для каждого стандарта. Концентрация НСЕ в образцах пациента рассчитывается по калибровочной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

- Каждый набор содержит реагенты для 96 тестов.
- Срок годности набора указан на упаковке.
- Не используйте набор после истечения срока годности.
- Не смешивайте реагенты из различных лотов.
- Храните набор при 2-8°C.
- Стабильность вскрытых реагентов указана в таблице ниже, при условии, что они не были контаминированы, хранились в тщательно закрытых оригинальных упаковках и хранятся и используются, как описано. Немедленно возвращайте реагенты в холодильник (2-8°C) после использования.

Компонент	Количество	Срок годности и хранение
-----------	------------	--------------------------

MICROPLA		
Микропланшет	1 планшет	2-8°C до истечения срока годности

12x8 микроячеек, покрытых стрептавидином. После вскрытия немедленно верните неиспользованные стрипы в алюминиевый пакет с осушителем и тщательно запечатайте пакет, храните сухим.

Стандарты НСЕ	5 флаконов, лиофилизированные.	4 недели при 2-8°C 3 месяца при -20°C
---------------	--------------------------------	--

CAL	NSE	A	HCE A 1x0.75 мл
CAL	NSE	B	HCE B 1x0.75 мл
CAL	NSE	C	HCE C 1x0.75 мл
CAL	NSE	D	HCE D 1x0.75 мл
CAL	NSE	E	HCE E 1x0.75 мл

Лиофилизированные стандарты содержат человеческий НСЕ в белковом матрикссе, 0.01 % метил-изоциазолин (МИТ) в качестве консерванта. Перед использованием должны быть разведены 0.75 мл воды.

Замечание: точные концентрации НСЕ специфичны для каждого лота и проставлены на этикетках каждого флакона.

BIOTIN Anti-NSE

Биотин/анти НСЕ	1 фл. 15 мл	2-8°C до истечения срока годности
-----------------	-------------	-----------------------------------

Биотин анти-НСЕ моноклональные антитела мыши \approx 2 мкг/мл. Содержит фосфатный буфер (pH 7.1), бычий сывороточный альбумин, блокирующий реагент, инертный голубой краситель и 0.01% МИТ в качестве консерванта. Должен быть смешан перед использованием с трейсером, HRP/анти-НСЕ.

CONJ Anti-NSE

Трейсер	1 фл. 0.75 мл	2-8°C до истечения срока годности
---------	---------------	-----------------------------------

Сток-раствор конъюгата HRP с анти-НСЕ моноклональными антителами мыши \approx 40 мкг/мл. Должен быть перед использованием смешан с Биотин/анти-НСЕ. Содержит 0.02% МИТ, 0.02 % бромнитродидоксана и 20 ppm Proclin™ 300.

SUBS TMB

Субстрат ТМБ	1 фл. 12 мл	2-8°C до истечения срока годности
--------------	-------------	-----------------------------------

Готов к использованию. Содержит забуференный раствор перекиси водорода и 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ).

STOP

Сток-раствор	1 фл. 15 мл	2-8°C до истечения срока годности
--------------	-------------	-----------------------------------

Готов к использованию. Содержит 0.12 М соляная кислота.

WASHBUF 25X

Концентрат буфера для промывок	1 фл. 50 мл	2-8°C до истечения срока годности
--------------------------------	-------------	-----------------------------------

Должен быть разведен перед использованием в 25 раз водой. Содержит Tris-HCl буферный солевой раствор с ТВИН 20 и Germall II в качестве консерванта.

Показатели нестабильности

Раствор субстрата ТМБ должен быть бесцветным или слабо голубым. Голубое окрашивание указывает на то, что реагент был загрязнен и должен быть выброшен.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для диагностики in vitro

- Только для профессионального использования
- Процедуры техники безопасности работы в лаборатории описаны в публикациях №№ 88—8395 U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) (CDC) или используйте локальные или национальные руководства.
- Со всеми образцами, взятыми у пациентов, необходимо обращаться как с потенциально инфекционноопасным материалом.
- Следуйте локальным руководствам по утилизации всех отходов.

Внимание

Материалы человеческого происхождения, использованные для приготовления реагентов набора, были протестированы и для них получены отрицательные результаты при тестировании на содержание антител к HIV 1 и 2, антител к HCV и поверхностного антигена гепатита В (HBsAg). Так как не существует метода, который бы полностью исключал присутствие возбудителей инфекционных заболеваний, работа и утилизация препаратов человеческого происхождения, поставляемых с данным набором, должна проводиться как с потенциально опасными материалами.

СБОР ОБРАЗЦОВ

Набор разработан для использования сыворотки. Соберите кровь венопункцией и отделите сыворотку стандартной процедурой. Сыворотка должна быть отделена в течение 60 минут после сбора образцов, чтобы избежать выхода NSE из клеток крови. Не используйте гемолизные образцы. Использование плазмы не рекомендуется, так как значительное количество НСЕ может высвобождаться из тромбоцитов.

Образцы могут храниться 24 часа при 2-8°C. Для более длительного хранения их требуется замораживать при -70°C или ниже. Образцы нельзя хранить в саморазмораживающихся холодильниках. Замораживайте только один раз. Образцы не могут оттаять и быть опять заморожены перед анализом. Позвольте замороженным образцам медленно оттаять при 2-8°C в течение ночи и затем приведите образцы к комнатной температуре перед анализом.

ПРОЦЕДУРА

Требуемые материалы, не поставляемые с набором

1. **Шейкер для микропланшета**
Встряхивание должно быть средним или энергичным. Продольный шейкер должен давать около 200 движений в минуту, орбитальный - 700-900.
2. **Устройство для промывки плашек**
Автоматическое промывочное устройство с возможностью выполнять от 1 до 6 циклов промывки или полуавтоматическое устройство, соединенное с вакуумным или водоструйным насосом и емкостью для сбора аспирированной жидкости. При отсутствии автоматического оборудования для промывок, могут быть использованы многоканальные пипетки.
3. **Микропланшетный ридер** с длиной волны 620 нм и/или 405 нм и диапазоном считывания от 0 до 3.0.
Все необходимое оборудование может быть поставлено ЗАО БиоХимМак, Москва.
4. **Микропипетки** с одноразовыми пластиковыми наконечниками для раскапывания микрообъемов жидкостей. 8-канальная пипетка для раскапывания 100 мкл желательна, но не обязательна. Пипетки для внесения миллилитровых объемов.
5. **Дистиллированная или деионизированная вода**
Для растворения стандартов НСЕ и для разведения буфера для промывок.
По желанию пользователей ЗАО БиоХимМак поставит также контрольные материалы, аттестованные на этом наборе.

Замечания по протоколу анализа

1. Для получения хороших результатов важно хорошо понимать настоящую методику и точно следовать ей. Реагенты, поставляемые с набором, представляют собой единое целое. Не смешивайте идентичные реагенты из наборов, имеющих разные номера лотов. Не используйте реагенты набора после истечения срока годности, напечатанного на внешней стороне коробки.
2. Перед использованием реагенты должны быть доведены до комнатной температуры (20-25°C). Для получения точных результатов анализ следует проводить при температуре 20-25°C. Замороженные образцы после оттаивания должны быть аккуратно, но тщательно перемешаны.
3. Перед раскапыванием стандартов и образцов сывороток пациентов рекомендуется промаркировать стрипы для возможности их четкой идентификации в течение и после анализа.
4. Необходима тщательная промывка стрипов. Убедитесь в том, что каждая ячейка заполняется полностью, что аспирация жидкости между циклами и в конце полная, и что ячейки сухие.

(ЗАО «БиоХимМак» рекомендует объем не менее 400 мкл для автоматической промывки и не менее 350 мкл – для ручной промывки) Если осталась часть жидкости, переверните планшет на фильтровальную бумагу и легко постучите по нему.

Автоматическая промывка: Следуйте инструкциям производителя прибора. Нельзя надолго оставлять промывающее устройство с промывочным раствором, так как иглы могут засориться и давать в дальнейшем неполную промывку.

5. Раствор субстрат ТМВ очень чувствителен к контаминации. Для оптимальной стабильности раствора субстрата ТМВ, перенесите необходимое количество субстрата из флакона в тщательно промытый чистый резервуар, или, предпочтительно, одноразовую пластиковую ванночку, чтобы избежать контаминации реагента. Используйте только чистые одноразовые наконечники
6. Используйте только чистые одноразовые пластиковые наконечники и правильную технику пипетирования при работе с реагентами и образцами. Избегайте переноса жидкостей между лунками, держите наконечник пипетки чуть выше верха лунки и не прикасайтесь пластика стрипа или поверхности жидкости в лунках. Использование правильной техники пипетирования особенно важно при работе с раствором субстрата ТМВ.

Приготовление реагентов	Стабильность приготовленного реагента
-------------------------	---------------------------------------

Стандарты НСЕ	4 недели при 2-8°C 3 месяца при -20°C
----------------------	--

Добавьте точно 0.75 мл дистиллированной воды в каждый флакон и хорошо перемешайте. Оставьте на 15 минут при комнатной температуре для полного растворения.

Замечание: точные концентрации стандартов указаны на флаконах и должны использоваться для расчетов.

Буфер для промывок	2 недели при 2-25°C в закрытом контейнере
---------------------------	---

Налейте 50 мл концентрата буфера для промывок в чистый контейнер и добавьте 1200 мл дистиллированной или деионизированной воды (разведение в 25 раз).

Раствор антител	3 недели при 2-8°C
------------------------	--------------------

Приготовьте требуемое количество раствора антител, смешав по 50 мкл трейсера – HRP/анти-НСЕ и 1 мл биотинилированных анти-НСЕ антител для тестирования на 1 стрипе:

Количество стрипов	Трейсер HRP/анти-НСЕ, (мкл)	Биотин/анти-НСЕ, (мл)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Убедитесь, что пластик и стеклянная посуда для приготовления раствора антител, чистые.

Другой вариант: Вылейте содержимое флакона с трейсером во флакон с Биотином анти-НСЕ и перемешайте. Проверьте, полностью ли перенесено содержимое флакона с трейсером.

Замечание: раствор антител стабилен 3 недели при хранении при 2-8°C. Не готовьте его больше, чем требуется для анализов на этот период. Храните раствор правильно.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

Проводите все тестирования образцов и калибраторов в дублях. Калибровочная кривая должна тестироваться при каждой постановке.

Все реагенты и образцы перед тестированием должны достичь комнатной температуры (20-25 °C).

1. Начните с приготовления стандартов НСЕ, буфера для промывок и раствора антител. Очень важно использовать только чистые

емкости для приготовления реагентов. Строго соблюдайте инструкции

2. Закрепите требуемое количество микроstriпов в держателе. Немедленно верните неиспользуемые стрипы в пластиковый пакет с осушителем и тщательно закройте его. Промойте каждый стрип один раз промывочным раствором. Не промывайте больше стрипов, чем собираетесь использовать в течение 30 минут.
3. Внесите по 25 мкл стандартов НСЕ (ст. А, В, С, D, E) и образцов сывороток пациентов (пр) в ячейки согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5 и т.д.
A	ст. А	ст. Е	пр. 4		
B	ст. А	ст. Е	и т.д.		
C	ст. В	пр. 1			
D	ст. В	пр. 1			
E	ст. С	пр. 2			
F	ст. С	пр. 2			
G	ст. D	пр. 3			
H	ст. D	пр. 3			

4. Внесите по 100 мкл раствора антител в каждую ячейку, используя одно- или восьмиканальную калиброванную пипетку. Избегайте переноса жидкостей между лунками, держите наконечник пипетки чуть выше верха лунки. Избегайте касания стрипов или поверхности жидкости.
5. Инкубируйте держатель со стрипами 1 час (\pm 10 минут) при комнатной температуре (20-25°C) с постоянным перемешиванием планшета на шейкере для микропланшетов.
6. После инкубации удалите жидкость и промойте каждый стрип 6 раз.
7. Добавьте в каждую ячейку по 100 мкл субстрата ТМВ, как описано в шаге 4. Раствор субстрата следует добавлять по возможности быстро, время между добавлением в первую и последнюю ячейку не должно превышать 5 минут.
8. Инкубируйте 30 минут (\pm 5 минут) при комнатной температуре с постоянным перемешиванием планшета на шейкере. Избегайте попадания прямого солнечного света.
9. Немедленно считайте оптическую плотность на ридере при 620 нм.

Альтернативный вариант

Если в лаборатории нет ридера с фильтром на 620 нм, оптическая плотность может быть определена как описано в шаге 10.

10. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую ячейку, перемешайте и после этого в течение 150 минут считайте оптическую плотность при 405 нм.

Измеряемый диапазон

С помощью данного набора CanAg NSE EIA можно измерить концентрации НСЕ в диапазоне от 1 до приблизительно 150 мкг/л. Если концентрация аналита в образце выше диапазона измеряемых значений, образец рекомендуется развести человеческой сывороткой с низкой концентрацией НСЕ и проанализировать еще раз.

Замечание: Сыворотка, используемая для разведения, тоже должна быть протестирована для определения концентрации эндогенного НСЕ (см. "Расчет результатов").

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля достоверности анализа используют Контроль 1 и Контроль 2. Допустимый диапазон указан на флаконе каждого контроля.

Если контрольные результаты не укладываются в указанный диапазон, тщательно проверьте все реагенты и фотометр и повторите анализ. Каждая лаборатория может приготовить свои собственные пулы сывороток различных уровней, которые можно использовать в качестве внутренних контрольных сывороток.

РЕФЕРЕНСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Так как не существует общепризнанных международных референсных материалов для антигена НСЕ, калибраторы, входящие в состав данного набора CanAg NSE EIA прокалиброваны по внутреннему референсному стандарту НСЕ.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Если используется ридер со встроенной программой обработки данных, по инструкции к ридеру создайте программу, используя концентрацию каждого стандарта НСЕ, указанную на каждом флаконе.

Для автоматического расчета результатов рекомендуется использовать следующие методы:

- Метод аппроксимации кубический сплайн. Стандарт А должен быть включен в калибровочную кривую со значением 0 мкг/л.
- Метод аппроксимации гладкий сплайн. Стандарт А должен быть использован как бланк.
- Интерполяция от точки к точке. Стандарт А должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.
- Квадратичная регрессия. Стандарт А должен быть включен в кривую со значением 0 мкг/л.

Замечание: 4-параметрическая или линейная регрессия не должны использоваться в этом методе.

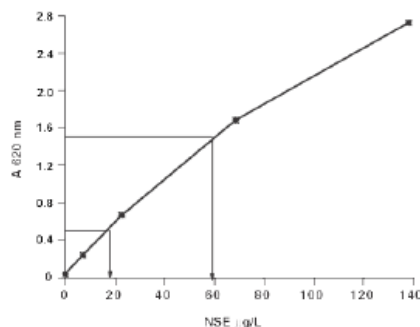
Для ручных расчетов стандартная кривая строится откладыванием значений оптической плотности (А), полученных для каждого стандарта против соответствующих концентраций НСЕ (в мкг/л) (см. рисунок 1). Значения концентраций НСЕ в образцах для каждого пациента находятся из калибровочной кривой.

Если образец дает значение НСЕ больше значения стандарта Е, необходимо разбавить его в соотношении 1/10 нормальной человеческой сывороткой для получения точного результата.

Результаты затем вычисляются следующим образом:

Разведение 1/10:

$$10 \times ([NSE]_{\text{разведенного образца}} - (0.9 \times [NSE]_{\text{нормальная человеческая сыворотка}}))$$



Пример результатов

Образец	Значение стандарта	Оптическая плотность (A)	НСЕ мкг/л
Стандарт А	0 мкг/л	0.037	
Стандарт В	7.5 мкг/л	0.238	
Стандарт С	22.9 мкг/л	0.663	
Стандарт D	68.4 мкг/л	1.688	
Стандарт E	138.0 мкг/л	2.720	
Образец 1		0.518	17.5
Образец 2		1.474	57.8

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Уровни НСЕ не могут быть использованы как абсолютное доказательство присутствия или отсутствия злокачественных опухолей, а набор НСЕ не должен использоваться для скрининга онкологических больных. Результаты тестирования должны интерпретироваться только в связи с другими исследованиями и методами диагностики заболеваний, и НСЕ-тест не должен замещать другие клинические исследования.

Повышенные значения НСЕ, обусловленные не опухолями, могут встречаться у диализных пациентов и пациентов с лейкомиями.

Сыворотка не должна иметь видимого гемолиза (оптическая плотность не мутного образца при длине волны 500 нм не должна превышать 0.3), так как эритроциты содержат значительные количества НСЕ (7). Продолжительное хранение цельной крови может вызывать высвобождение НСЕ из клеток крови.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ожидается, что у здоровых людей концентрация НСЕ не превышает 13 мкг/л. Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных значений, так как он может варьировать в зависимости от таких факторов, как диета, климат, условия жизни, подборка пациентов, и т.д.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Воспроизводимость была определена согласно руководству EP5-A NCCLS (8), с использованием четырех уровней замороженной пулированной человеческой сыворотки, содержащей добавленную НСЕ. Каждый образец был случайным образом пипетирован, в дублях, и протестирован дважды в день, каждый день в течение 20 дней.

Анализ проводился на протяжении 40 месяцев, более чем тремя различными исполнителями и с использованием наборов CanAg NSE EIA из 20 различных лотов.

Образец	Повторы	Среднее мкг/л	SD, мкг/л, внутри серии	CV внутри серии, %	SD, мкг/л, между сериями	CV между сериями, %
NSE	80	10.3	0.24	2.3	0.57	5.5
NSE	80	23.7	0.82	3.5	0.97	4.1
NSE	80	48.2	1.02	2.1	1.93	4.0
NSE	80	92.7	1.60	1.7	3.44	3.7

Предел обнаружения (чувствительность)

Предел обнаружения для данного набора < 1 мкг/л определен как концентрация, соответствующая значению оптической плотности стандарта А плюс 2 стандартных отклонения, и рассчитан по формуле:

$$\frac{2 \times SD \text{ CAL A}}{OD \text{ CAL B} - OD \text{ CAL A}} \times [\text{CAL B}] \text{ мкг/л}$$

Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдается для образцов с концентрациями до 200000 мкг/л.

Линейность

Пробы пациентов были разбавлены разбавителем образцов НСЕ и проанализированы. Полученные значения были в пределах 93-101%.

Специфичность

Используемые моноклональные антитела специфичны к γ -субъединице енoлазы. Измеряемых перекрестных реакций с другими енoлазами не наблюдалось. В соответствии с руководством EP7-P NCCLS (9) было проведено исследование возможных источников интерференции. Следующие вещества были протестированы в указанных концентрациях и показано, что они не оказывают значительного влияния на результаты анализа:

	Концентрации, не оказывающие значительного ($\pm 10\%$) влияния на результаты
Липемия (Intralipid®)	10 мг/мл
Билирубин, несвязанный	0.6 мг/мл

ГАРАНТИИ

Характеристики набора, представленные выше, получены по этой методике. Любые изменения или модификации методики не рекомендуются производителем. На такие ситуации гарантии производителя не распространяются.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

НАБОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙРОН-СПЕЦИФИЧНОЙ ЭНОЛАЗЫ (НСЕ)

Кат. № 420-10 - 96 тестов

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Смешивайте компоненты непосредственно перед использованием. Используйте условия встряхивания в соответствии с инструкциями.

Шаг	Флакон/Планшета	Действия
1. Приготовить стандарты НСЕ	НСЕ стандарты А, В, С, D, Е	Добавить 0.75 мл дистиллированной воды в каждый сосуд и осторожно перемешать. Оставить на 15 минут. Замечание: точная концентрация каждого стандарта указана на этикетке. Это значение должно использоваться для расчетов.
2. Приготовить буфер для промывок	Концентрат буфера для промывок	Разбавить 50 мл концентрата промывочного раствора 1200 мл дистиллированной воды
3. Приготовить раствор антител	Трейсер Биотин/анти-НСЕ	Смешать 50 мкл трейсера с 1 мл Биотин анти-НСЕ на каждый стрип.
4. Промывка	Планшет	Промыть каждую ячейку один раз промывочным раствором
5. Добавить стандарты и образцы	А, В, С, D, Е	25 мкл в каждую ячейку
6. Добавить раствор антител	Раствор антител	100 мкл в каждую ячейку
7. Инкубация	Планшет	1 час, встряхивая при комнатной температуре
8. Промывка	Планшет	Промыть каждую ячейку 6 раз промывочным раствором
9. Добавление субстрата	Субстрат ТМБ	100 мкл в каждую ячейку
10. Инкубация	Планшет	30 минут, встряхивая при комнатной температуре
11. Считывание	Планшет	620 нм
Альтернативно:		
11а. Добавить стоп-раствор	Стоп-раствор	100 мкл в каждую ячейку
12а. Инкубация	Планшет	1 мин, встряхивая при комнатной температуре
13а. Считывание	Планшет	Считать при 405 нм в течение 15 минут