کیت سنجش CEA به روش الایزا

مقدمه :

CEA یک مولکول گلیکو پروتئینی است که در سال ۱۹۶۵ توسط Gold و Freedman کشف شد. فامیل بزرگ CEA شامل حدود ۳۶ گلیکو پروتئین مختلف است که پروتئینهای اصلی آن شامل CEA و آنتی ژن واکنش متقاطع دهنده غیر اختصاصی (NCA) میباشد که ساختمان دومن آنها بسیار شبیه به زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین G است . CEA با وزن مولکولی ۳۰۰ – ۱۵۰ کیلو دالتون حاوی ۵۵ – ۴۵ درصد کربوهیدرات است و زنجیره پلی پپتیدی آن حاوی ۶۴۱ اسید آمینه می باشد. این گلیکوپروتئین در طی دوران جنینی توسط سلولهای آندوتلیال و پس از تولد عمدتاً توسط سلولهای اپی تلیال تولید می شود که در سطح لومینال این سلولها ظاهر می گردد. علاوه بر این در سطح غشاء سلول هم در سلولهای کانسر کولون و هم در سلولهای روده جنین یافت می شود . سطح خونی CEA وابسته به فاکتورهای متعددی از جمله سطح بیان ژن ، میزان سنتز آن ، آزاد سازی آن توسط تومور، نیمه عمر در جریان خون، درجه نکروز و درجه واسکولیزاسیون تومور و کاتابولیسم CEA توسط کبد می باشد . میزان CEA در آقایان بیشتر از خانم ها بوده و در افراد مسن بیشتر از افراد جوان است . بیش از ۸۰ درصد از افراد مبتلا به آدنوکارسینوم پیشرفته کولون دارای CEA بالاتر از حد طبیعی هستند. با این حال سنجش CEA به عنوان تنها تست تشخیصی برای موارد مشکوک به کانسر استفاده نمی شود و CEA بالا در افراد علامت دار نمی تواند به عنوان یک شاخص رشد تومور تفسیر شود چرا که شرایط خوش خیم دیگری نیز وجود دارد که میزان CEA در آنها افزایش می یابد. این شرایط شامل بیماری مزمن کبدی (در ۹۰ درصد موارد)، بیماری حاد کبدی (در ۵۰ درصد موارد) ، سیروز کبدی (در ۴۵ درصد موارد)، آمفیزم ریوی (در۳۰ درصد موارد) ، پولیپ گوارشی (در ۵ درصد موارد) و کولیت خونریزی دهنده (در ۱۵ درصد موارد) است که CEA در آنها افزایش می یابد. با این حال در شرایط خوش خیم به ندرت افزایش بارز در میزان CEA دیده می شود (در اکثر موارد میزان CEA کمتر از ۱۰ نانوگرم در میلی لیتراست). CEA در ۴۰ درصد از موارد کانسر پستان، ۵۵ درصد از موارد کانسر پانکراس ، ۴۵ درصد از موارد کانسر ریه ، ۲۵ درصد از موارد کانسر تخمدان ، ۵۰ درصد از موارد کانسر معده و ۴۰ درصد از موارد کانسر رحم افزایش می یابد . CEA نه تنها در تشخیص، بلکه در کمک به تعیین مرحله کانسر، پیگیری درمان و تعیین پیش آگهی کانسر کولورکتال نیز اهمیت دارد اما به عنوان یک تست غربالگری در تشخیص کانسرهای کولورکتال از ارزش کمتری برخوردار است. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون CEA را با اختصاصیت و حساسیت بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک CEA پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده، پس از انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد CEA متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت CEA در نمونه ها متناسب است، پس از شستشو ، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد CEA (Anti-CEA Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) سری استانداردها (Standard Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای ۰ , ۲, ۵ , ۲۰ , ۵۰ , ۱۰۰ CEA ng/ml کالیبره شده در مقابل استاندارد WHO 1st IRP 73 / 601 (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند) .
۴) سرم کنترل : دو ویال هر کدام حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۷) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

تهران،شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۲

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضاء نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر ۳۰ روز) در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری نمود. در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شود .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) ۵۰ میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد ، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بزنید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۴) .
۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۸) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .

تهران،شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۲

۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید. (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

محاسبه نتایج :

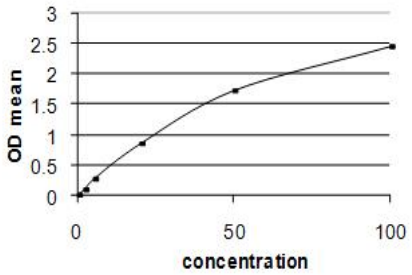
از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

استانداردها (ng/ml)	جذب نوری
۰	۰/۰۲
۲	۰/۱۱
۵	۰/۲۷
۲۰	۰/۸۴
۵۰	۱/۷۲
۱۰۰	۲/۴۶



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال درسرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

محدوده مرجع برحسب واحد ng/ml			
محدوده مرجع (۹۵٪ حدود اطمینان)	انحراف استاندارد	میانگین	
۰/۳ – ۵	۱/۱	۱/۶	افراد غیر سیگاری
۰/۴ – ۸/۵	۱/۶	۳/۱	افراد سیگاری

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت CEA قابل تشخیص در این کیت ۰/۲ ng/ml می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا – اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر – اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف CEA انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

تهران،شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۲

جدول شماره ۱ (اینترا - اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۴/۵	۰/۱۵	۳/۳
۲	۲۴	۲۳/۲	۰/۹۶	۴/۱
۳	۲۴	۶۷/۳	۲/۵	۳/۷

جدول شماره ۲ (اینتر - اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۵/۵	۰/۲۸	۵/۱
۲	۱۰	۲۲/۲	۱/۱۹	۵/۳
۳	۱۰	۷۴	۵/۱	۶/۹

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکاوری آزمایش :

سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از CEA به ۴ سرم با غلظتهای مشخص CEA افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :
* جهت تست ریکاوری از استاندارد های کیت استفاده نشود .

جدول ریکاوری :

نمونه	مقدارCEA موجود در سرم (ng/ml)	مقدارافزوده شدهCEA (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکاوری (%)
۱	۱/۲	۵	۳/۱	۲/۸۵	۹۰
۱	۱/۲	۲۰	۱۰/۶	۱۱	۱۰۳
۱	۱/۲	۱۰۰	۵۰/۶	۴۹	۹۷
۲	۸/۳	۵	۶/۶	۶/۱	۹۲
۲	۸/۳	۲۰	۱۴/۱	۱۵/۱	۱۰۷
۲	۸/۳	۱۰۰	۵۴	۵۸	۱۰۷
۳	۲۲/۸	۵	۱۳/۹	۱۵	۱۰۸
۳	۲۲/۸	۲۰	۲۱/۴	۲۱	۹۸
۳	۲۲/۸	۱۰۰	۶۱/۴	۶۳	۱۰۲
۴	۶۷/۲	۵	۳۶/۱	۳۴/۴	۹۵
۴	۶۷/۲	۲۰	۴۳/۶	۴۷	۱۰۸
۴	۶۷/۲	۱۰۰	۸۳/۶	۸۸	۱۰۵

٤) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۳ نمونه سرم با غظت مشخص از CEA تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

تهران،شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۲

جدول خطی بودن :

نمونه	مقدار CEA موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	ریکاوری (%)				
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۳۲
۱	۸۴	۱۰۴	۹۸	۸۹	۱۰۶	۹۳
۲	۵۷	۹۹	۱۰۰	۹۲	۹۵	۹۰
۳	۳۵	۱۰۲	۹۵	۹۸	۱۱۰	۱۰۸

0) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش CEA جهت سرمهائی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۵ µg/ml) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد.

References :

1 - Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. Journal of Experimental Medicine 121: 439; 1965.
2-Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembyronic antigens of the human digestive system. Journal of Experimental Medicine 122: 467; 1965.
3 - Krupey J, Gold P, Freedman SO. Purification and characterization of carcinoembryonic antigens of the human digestive system. Nature 215(96): 67-68; 1967.
4 - Terry WD, Henkart PA, Coligan JE, et al. Carcinoembryonic antigen: characterization and clinical applications. Transplantation Reviews 20(0): 100-129; 1974.
5 - Oikawa S, Nakazato H, Kosaki G. Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. Biochemical & Biophysical Research Communications 142(2): 511-518; 1987.
6 - Tawaragi Y, Oikawa S, Matsuoka Y, et al. Primary structure of nonspecific crossreacting antigen (NCA), a member of carcinoembryonic antigen (CEA) gene family, deduced from cDNA sequence. Biochemical & Biophysical Research Communications 150(1): 89-96; 1988
7 - Thompson J, Zimmermann W. The carcinoembryonic antigen gene family: structure, expression and evolution. Tumour Biology 9(2-3): 63-83; 1988
8- Jessup JM. Tumor markers: prognostic and therapeutic implication. In Wanebo HJ, ed. Colorectal Cancer. Mosby: St. Louis; 1993.
9 - Goldenberg DM, Neville AM, Carter AC. CEA (carcinoembryonic antigen): its role as a marker in the management of cancer. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology 101(3): 239-242; 1981

10 - Pusztaszeri G, Mach J-P. Carcinoembryonic antigen (CEA) in non-digestive cancerous and normal tissues. Immunochemistry 10(3):197-204; 1973.

11 - Loewenstein MS, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states. Cancer 42(3 Suppl): 1412-1418; 1978.

12 - Chu TM, Lavin P, Day J, et al. Carcino-embryonic antigen: prognosis and monitoring of cancer. In: Lehmann FG, ed. Carcinoembryonic Proteins, vol. I. Amsterdam: Elsevier/ North-Holland;1979:55-64.

تهران،شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۲

روش انجام آزمایش CEA بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد CEA			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر
اسی بافر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید .طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر(ودرصورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			

تهران،شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۲