

کیت سنجش CA125 به روش الایزا

حیطه کاربرد :

کیت الایزای CA125 پیش‌تاز طب، برای سنجش کمی CA125 در سرم انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیص در بیماران سرطان تخمدان همراه با سایر تظاهرات بالینی و روشهای تشخیصی به کار می رود. محتوی این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد.

مقدمه :

CA125 که موسسین ۱۶ نیز نامیده می شود، یک آنتی ژن سطحی مرتبط با سرطان سلولهای اپی تلیال تخمدان محسوب می شود. CA125 در سرم همراه با گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی بالا می باشد. مطالعات چاپ شده نشان داده اند که افزایش سطح سرمی CA125 در افرادی با اندومتریوز شدید و کارسینومای تخمدان مشاهده می شود. در حال حاضر CA125 متداول ترین بیومارکر در دسترس برای سرطان تخمدان می باشد. غلظت سرمی CA125 در ۷۵ تا ۹۰ درصد بیماران مبتلا به تومور اپی تلیال تخمدان افزایش می یابد. CA125 در سایر شرایط غیر توموری مانند قاعدگی، بارداری و بیماری التهابی لگن افزایش می یابد. در این راستا CA125 سرمی در ۱٪ زنان سالم، ۳٪ زنان سالم با بیماریهای خوش خیم تخمدان و ۶٪ بیماران با شرایط غیر بدخیمی مانند سه ماه اول بارداری، اندومتریوزیس، فیبروز رحمی، عفونت حاد لوله های فالوپ، بیماریهای کبدی، التهاب پریتون، پریکارد یا پلور افزایش می یابد. CA125 سرمی برای پایش پاسخ به شیمی درمانی، عود و پیشرفت بیماری در بیماران سرطان تخمدان کاربرد دارد. اگرچه نقش آن در غربالگری و تشخیص زودرس سرطان تخمدان به علت پایین بودن حساسیت و اختصاصیت محدود می باشد. از این رو کیت الایزای CA125 پیش‌تاز طب می تواند به عنوان یک ابزار کمک تشخیص در بیماران سرطان تخمدان همراه با سایر روشهای تشخیصی مانند التراسونوگرافی داخل واژن به کار برده شود.

اساس آزمایش :

اساس کیت سنجش CA125 به روش الایزای ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی مونوکلونال علیه یکی از شاخصهای آنتی ژنیک CA125 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 CA125 متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت CA125 در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموفور 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) یک عدد پلیت دارای ۹۶ عدد چاهک پوشش داده شده با آنتی بادی مونوکلونال ضد CA125
- (۲) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها (آماده برای مصرف - آبی رنگ)
- (۳) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول آنتی بادی ضد CA125 متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده برای مصرف - قرمز رنگ)
- (۴) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۵ ویال ۱ میلی لیتری از استاندارد با غلظتهای ۰، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ U/ml از CA125 (استاندارد صفر ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها ۱ میلی لیتر می باشند) (آماده برای مصرف - سبز رنگ)

- ۵) سرم کنترل پایین (Low Control Serum): یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص CA125 رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف - آبی رنگ). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است.
- ۶) سرم کنترل بالا (High Control Serum): یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص CA125 رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف - قرمز رنگ). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است.
- ۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف - بی رنگ)
- ۸) محلول شستشو (Wash Buffer): یک ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول شستشوی غلیظ (20x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ تونین: جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۲۰/۱ رقیق نمایید.
- ۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال
- ۱۰) یک عدد برچسب مخصوص پلیت
- ۱۱) دستورالعمل مصرف

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

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)
- ۲) سمپلرهای دقیق و کالیبره ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری و سر سمپلرهای مخصوص یکبار مصرف
- ۳) کاغذ نمگیر
- ۴) آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند.
- ۲) تمامی محتویات کیت تنها برای استفاده تشخیصی در آزمایشگاه می باشند.
- ۳) تنها پرسنل آموزش دیده بایستی از این تست استفاده نمایند.
- ۴) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری CA125 در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است.
- ۵) از مخلوط کردن محتویات کیت با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید.
- ۶) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادیهای 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 و از وسایل ایمنی لازم در آزمایشگاه استفاده نمایند.
- ۷) نمونه بیمار، استاندارد، کنترلها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

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 انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد.

۴) ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید. قبل از تهیه محلول شستشوی کار، برای حل شدن کریستالها، ویال را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. محلول شستشو را به نسبت ۱/۲۰ به میزان مورد نیاز با آب مقطر رقیق نمایید، این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم را می توان پس از جدا نمودن از لخته خون استفاده نمود. نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی :

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند. پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهکهای مورد نیاز را بردارید.
- ۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند. از خشک شدن چاهکها در بین مراحل انکوباسیون پرهیز شود.
- ۳) حتما از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود.
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهک ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک ها تخلیه شوند.
- 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 آنها را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود.

مراحل انجام آزمایش :

- ۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده 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 به صورت دابلیکیت 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. استانداردها، سرم های کنترل و نمونه ها را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید. پنج چاهک اول برای استانداردهای مختلف، دو چاهک بعدی به ترتیب برای سرم کنترل پایین و بالا و سایر چاهک ها را برای نمونه ها 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 به خوبی مخلوط شوند. درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- ۴) محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنانچه دستگاه واکس اتوماتیک در دسترس نباشد 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، چاهک ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.

- (۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) آماده مصرف را به داخل چاهک ها بریزید، پس از پوشاندن چاهک ها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- (۶) محتویات چاهک ها 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، چاهک ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
- (۸) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، واکنش های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهک ها را قرائت نمایید. توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- جذب نوری استاندارد صفر و ۴۰۰ U/ml به ترتیب کمتر از ۰/۱ و بیشتر از ۱/۴ قابل قبول است.

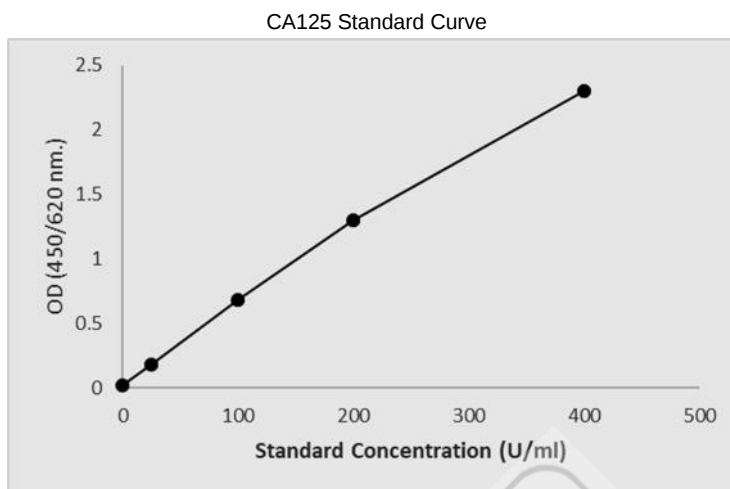
جذب نوری (450/630 nm)	استانداردها (U/ml)
< 0.1	0
> 1.4	400

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .

- (۱) جذب نوری استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر 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 را پیدا 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 .

جذب نوری (450/630 nm)	استانداردها (U/ml)
0.02	0
0.18	25
0.68	100
1.3	200
2.3	400



توجه : جذبه‌های 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 در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا به دست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

مقادیر سرمی CA125 در 283 خانم سالم اندازه گیری شد. میانگین داده ها 9.5 U/ml (8.5-10.5 با حدود اطمینان 95%) با انحراف معیار 8.5 U/ml محاسبه شد. مقدار mean+3SD نمونه های نرمال 35 U/ml محاسبه شد.

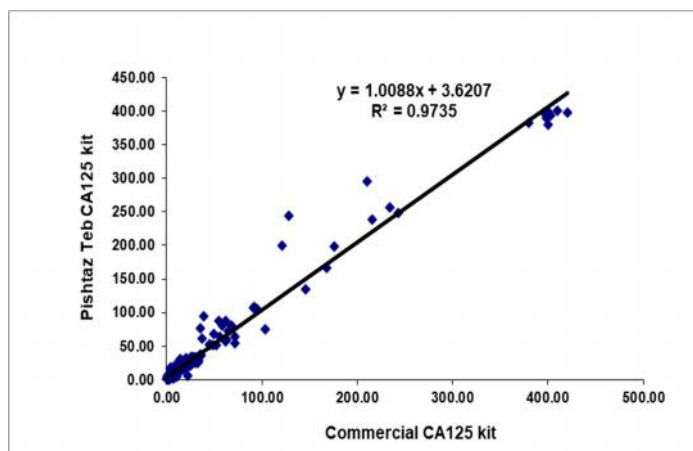
محدودیت های روش اندازه گیری:

هر چند طراحی این کیت به گونه ای است که از تاثیر عوامل مداخله گر تا حد امکان جلوگیری شود اما به ندرت امکان دارد بعضی عوامل موجود در نمونه سرم از جمله آنتی بادی های هتروفیلک برخی داروها اتوانتی بادی ها و نظایر اینها بر نتیجه آزمایش اثر بگذارند. بنابر این بهتر است تفسیر نتیجه آزمایش با در نظر گرفتن نتایج معاینات بالینی یافته های تشخیصی دیگر و شرح حال بیمار انجام گیرد .

شاخصهای اجرایی:

(۱) مطالعه مقایسه ای :

کیت سنجش CA125 شرکت پیش‌تاز طب با کیت تجاری مربوطه مقایسه شد. نمونه های سرم ۱۵۴ بیمار با تشخیص قطعی سرطان تخمدان خوش خیم و بدخیم مراجعه کننده به یکی از بیمارستانهای ریفال انکولوژی به همراه ۱۰۵ نمونه سرم افراد نرمال مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی برای تستهای مقایسه ای استفاده شدند. نتایج تستهای مقایسه ای بروی نمونه های ذکر شده بیانگر همبستگی ۹۸/۷٪ بین کیت پیش‌تاز طب و کیت تجاری معتبر بود.



۲) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت قابل تشخیص CA125 در این کیت ۱/۶ U/ml می باشد.

۳) دقت آزمایش:

جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمونهای دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) به وسیله سه نمونه سرمی با غلظتهای متفاوت CA125 انجام شد که نتایج آن در جداول مربوطه آمده است .

جدول ۱- آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

CV %	SD (U/ml)	میانگین (U/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	
4.00	0.46	11.53	20	نمونه ۱
0.67	1.71	256.58	20	نمونه ۲
3.00	9.63	319.84	20	نمونه ۳

جدول ۲- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

CV %	SD (U/ml)	میانگین (U/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	
9.66	1.09	11.28	20	نمونه ۱
5.59	13.68	244.81	20	نمونه ۲
4.02	15.26	379.10	20	نمونه ۳

۴) ریکاوری آزمایش :

مقادیر مشخصی از CA125 به سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از CA125 افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول مربوطه آمده است :

* جهت تست ریکاوری از استانداردهای کیت استفاده نشود .

جدول ۳- ریکاوری :

نمونه	مقدار CA125 موجود در سرم (U/ml)	مقدار CA125 افزوده شده (U/ml)	مقدار مورد انتظار (U/ml)	مقدار بدست آمده (U/ml)	ریکاوری (%)
1	29.3	185.3	107.3	108.85	101.4
1	29.3	96.55	62.925	62.7	99.6
1	29.3	20.5	24.9	25.75	103.4
2	12.6	185.3	152.95	153.2	100.2
2	12.6	96.55	108.575	104.05	95.8
2	12.6	20.5	70.55	70.45	99.9
3	256.4	185.3	220.85	211.75	95.9
3	256.4	96.55	176.475	163.1	92.4
3	256.4	20.5	138.45	138.15	99.8

۵) خطی بودن آزمایش :

برای تایید خطی بودن تست ،رقتهای سریالی از ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از CA125 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت و درصد ریکاوری محاسبه شد که در جدول مربوطه نتایج آن آورده شده است.

جدول ۴- خطی بودن :

نمونه	مقدار CA125 موجود در سرم رقیق نشده (U/ml)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
1	360.6	95.77	96.25	94.21	91.11
2	321.26	100.85	103.75	104.93	108.89
3	204.77	93.58	90.16	94.1	90.75

۶) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش CA125 جهت سرم های با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۵۰۰۰۰ U/ml) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد.

۷) واکنش متقاطع :

واکنش متقاطعی با آنتی ژن های CA15-3, CA19.9, PSA, AFP, CEA مشاهده نشد.

References:

- Urban N, Drescher C. Current and future developments in screening for ovarian cancer. *Womens Health (Lond)*. 2006;2(5):733-742.
- Whitwell HJ, Worthington J, Blyuss O, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Gunu R, Kalsi J, Menon U, Jacobs I, Zaikin A, Timms JF. Improved early detection of ovarian cancer using longitudinal multimarker models. *Br J Cancer*. 2020;122(6):847-856.
- Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res*. 2019;12(1):28.
- Matte I, Garde-Granger P, Bessette P, Piché A. Ascites from ovarian cancer patients stimulates MUC16 mucin expression and secretion in human peritoneal mesothelial cells through an Akt-dependent pathway. *BMC Cancer*. 2019;19(1):406.
- Bast R.C., Jr Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J. Clin. Oncol*. 2003;21:200S–205S.
- Pignata S, Cannella L, Leopardo D, Bruni GS, Facchini G, Pisano C. Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer: in favor of continuing to prescribe CA125 during follow-up. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 8:viii40-viii44.
- Miralles C., Orea M., Espana P., Provencio M., Sanchez A., Cantos B., Cubedo R., Carcereny E., Bonilla F., Gea T. Cancer antigen 125 associated with multiple benign and malignant pathologies. *Ann. Surg. Oncol*. 2003;10:150–154.
- Wang Q, Wu Y, Zhang H, Yang K, Tong Y, Chen L, Zhou Q, Guan S. Clinical Value of Serum HE4, CA125, CA72-4, and ROMA Index for Diagnosis of Ovarian Cancer and Prediction of Postoperative Recurrence. *Clin Lab*. 2019;65(4).
- Scholler N, Urban N. CA125 in ovarian cancer. *Biomark Med*. 2007;1(4):513-523.

روش انجام آزمایش CA125 به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد CA125			
نمونه	سرم کنترل	استاندارد	محلولها
-	-	۵۰ میکرولیتر	استاندارد
-	۵۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۵۰ میکرولیتر	-	-	نمونه
۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	اسی بافر
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. ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشوید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	آنزیم کونژوگه
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 بشوید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			