

## کیت سنجش CA15-3 به روش الیزا

### حیطه کاربرد :

کیت الیزای CA15-3 پیشداز طب ، برای سنجش کمی CA15-3 در سرم انسان طراحی شده است . این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در بیماران سرطان پستان همراه با سایر تظاهرات بالینی و روش های تشخیصی به کار می رود . محتوی این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد .

### مقدمه :

آنتی ژن CA15-3 از MUC1 مشتق شده و یکی از اولین عوامل پیش آگهی دهنده در سرطان پستان محسوب می شود . فاکتور های زیادی مانند BR27-29 ، TPA ، HER-2، و CEA در تشخیص سرطان سینه مطرح شده اند اما CA15-3 اولین فاکتور پیش آگهی دهنده در گردش می باشد. این تومور مارکر اغلب برای نظارت بر پاسخ درمان سرطان پستان و مراقبت از عود سرطان پستان استفاده می شود . همچنین ممکن است در تعیین میزان سرطان ( بار تومور ) نیز موثر باشد . در سرطان سینه سطح مارکر CA15-3 افزایش می یابد . هدف از انجام اندازه گیری تومور مارکر CA15-3 خون ، به منظور تشخیص سرطان سینه است . افزایش سطح CA15-3 ، همراه با آلکان فسفاتاز (ALP)، با افزایش احتمال عود زودرس در سرطان پستان در ارتباط است. CA 15-3 و CA 27-29 ممکن است در بیماران مبتلا به کیست خوش خیم تخمدان ، بیماری خوش خیم پستان و بیماری خوش خیم کبدی افزایش یابد . همچنین ممکن است افزایش در سیروز ، سارکوئیدوز و لوپوس نیز دیده شود . CA15-3 برای بررسی بیماران پس از درمان بسیار مفید است . ۹۶٪ بیماران که بعد از عمل جراحی دچار عود بیماری شده اند به ویژه بیماران متاستاتیک افزایش سطح CA15-3 را نشان داده اند ، بنابراین برای پیش بینی عود زودرس از آن استفاده می شود . افزایش ۲۵ درصدی CA15-3 سرم با پیشرفت کارسینوما همراه است . کاهش ۵۰٪ در سطح CA15-3 سرم با پاسخ به درمان همراه است . CA15-3 حساسیت بیشتری نسبت به CEA در تشخیص زودهنگام عود سرطان پستان دارد .

### اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد . در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهایی بر علیه یک شاخص آنتی ژنیک CA15-3 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 CA15-3 متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد . مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت CA15-3 در نمونه ها متناسب است ، پس از شستشو ، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) و کروموزن است به داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکهاست . 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 حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد CA15-3 (Anti-CA15-3 Coated Plate)
- (۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : ویال حاوی محلول کنژوگه آماده مصرف .
- (۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای ۰, ۲۵, ۵۰, ۱۵۰, ۳۰۰ و ۶۰۰ U/ml CA15-3 .
- (۴) سرم کنترل (Control Sera) : دو ویال حاوی سرم کنترل با غلظتهای مشخص شده بر روی برچسب ویال .
- (۵) محلول اسی بافر ( Assay Buffer ) : ویال حاوی محلول بافری آماده مصرف .
- (۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی محلول آماده مصرف .
- (۷) محلول شستشو (Wash Solution) : ویال حاوی 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) : ویال حاوی محلول آماده مصرف .
- (۹) برچسب مخصوص پلیت

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

- (۱) دستگاه الایزایدی با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
- (۲) سمپلر ۲۰ ، ۱۰۰ میکرو لیتر دقیق .
- (۳) آب مقطر .

## 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 .
- (۴) نمونه بیماران ، استانداردها ، کنترلها و چاهکهای استفاده شده ، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند . تمامی محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا 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 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 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 خون استفاده نمود ، نمونه را می توان به مدت سه 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 بپرهیز 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 حد اکثر 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 باقی چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- (۲) ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول اسی بافر ( Assay Buffer ) را به همه چاهکها اضافه نمایید.

۳) ۲۰ میکرو لیتر 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) 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 پنج 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 میکرو لیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمائید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بزیند تا قطرات اضافی خارج شوند).

۵) ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده، 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.

۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را پنج بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۴).

۷) ۱۰۰ میکرو لیتر 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.

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

### محاسبه نتایج :

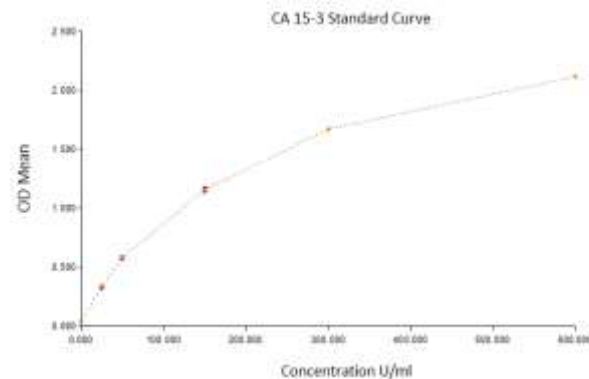
از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود.

۱) جذب نوری استانداردها 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.

استانداردها ( U/ml)	جذب نوری
۰	۰/۰۷
۲۵	۰/۳
۵۰	۰/۵
۱۵۰	۱/۱
۳۰۰	۱/۷
۶۰۰	۲/۳



**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 در سرم 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 U/ml			
محدوده مرجع (۹۵٪ حدود اطمینان)	انحراف استاندارد	میانگین	
تا ۳۰	۶/۱	۱۶/۶	افراد نرمال

**محدودیت روش اندازه گیری:** نتایج تست می بایست همراه با سایر تست ها و روش های تشخیصی مورد تفسیر قرار گیرد. گاهی اوقات آنتی بادی های هتروفیل که در نمونه سرم برخی از بیماران دیده می شوند، با وجود مواد بلاک کننده قوی ضد آنها در محلول های کیت، امکان تداخل دارند.

## شاخصهای اجرایی:

### (۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و محاسبات انجام شده (LOD): 3.2 U/ml , Limit of Blank(LOB) : 1 U/ml می باشد.

### (۲) دقت آزمایش:

آزمایشهای اینترا - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینترا - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۴ سرم با غلظتهای مختلف CA15-3 انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است:

### جدول شماره ۱ (اینترا - اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین U/ml	SD	CV %
۱	۲۰	۱۷/۵	۱/۵	۸/۶
۲	۲۰	۴۱	۳/۱	۷/۵
۳	۲۰	۱۲۹/۶	۷/۶	۵/۹
۴	۲۰	۳۴۶/۷	۸/۲	۲/۳

### جدول شماره ۲ (اینترا - اسی):

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین U/ml	SD	CV %
۱	۲۰	۱۶/۱	۰/۸	۵/۰
۲	۲۰	۳۹/۴	۲/۱	۵/۳
۳	۲۰	۱۵۲	۵/۵	۳/۶
۴	۲۰	۳۵۹/۴	۹/۲	۲/۵

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است.

### ۳) ریکواری آزمایش:

سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از CA15-3 به پنج سرم با غلظتهای مشخص CA15-3 افزوده شد و ریکواری محاسبه شده آنها عددی بین  $100 \pm 10$  درصد را نشان می دهد  
( جهت تست ریکواری از استاندارد های کیت استفاده نشود ) .

ریکواری (%)	مقدار بدست آمده ( U/ml)	مقدار مورد انتظار ( U/ml)	مقدار CA15-3 افزوده شده ( U/ml)	مقدار CA 15-3 موجود در سرم ( U/ml)	نمونه
۹۱/۶	۱۴/۲	۱۵/۵	۱۲	۱۹	۱
۹۵/۵	۲۵/۸	۲۷	۳۵	۱۹	۱
۱۰۳	۵۱	۴۹/۵	۸۰	۱۹	۱
۹۵/۳	۲۲/۴	۲۳/۵	۱۲	۳۵	۲
۹۹/۴	۳۴/۸	۳۵	۳۵	۳۵	۲
۱۰۴	۵۹/۸	۵۷/۵	۸۰	۳۵	۲
۱۰۵	۵۶/۲	۵۳/۵	۱۲	۹۵	۳
۱۰۷	۶۹/۷	۶۵	۳۵	۹۵	۳
۹۷/۴	۸۵/۳	۸۷/۵	۸۰	۹۵	۳
۹۶/۸	۸۹/۶	۹۲/۵	۱۲	۱۷۳	۴
۱۰۵/۷	۱۱۰	۱۰۴	۳۵	۱۷۳	۴
۱۰۵/۴	۱۳۳/۴	۱۲۶/۵	۸۰	۱۷۳	۴
۱۰۲/۶	۲۳۱/۷	۲۱۶	۱۲	۴۲۰	۵
۱۰۲	۲۳۲/۴	۲۲۷/۵	۳۵	۴۲۰	۵
۱۰۴/۴	۲۶۱	۲۵۰	۸۰	۴۲۰	۵

### ۴) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رفتهای متوالی ( ۱/۲ تا ۱/۱۶ ) ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از CA15-3 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شده عددی بین  $100 \pm 10$  درصد را نشان می دهد .

ریکواری (%)				مقدار CA15-3 موجود در سرم رقیق نشده ( U/ml)	نمونه
رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
۹۶	۹۰	۹۴	۹۵	۴۶۶	۱
۹۱	۹۵	۹۶	۹۳	۱۶۸	۲
۱۰۹	۱۰۸	۱۰۵	۹۸	۲۸۲	۳
۱۱۰	۱۰۹	۱۰۵	۱۰۷	۵۰۴	۴

## ۵) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهائی با غلظتهای مشخص از مواد اضافه شده مختلف به آنها ، جهت بررسی واکنشهای متقاطع با CA15-3 بررسی شد که نتایج آن در جدول صفحه بعد آمده است :

واکنش متقاطع	غلظت	آنالیت
< 3.2 U/ml	2300 U/ml	CA125
<3.2 U/ml	1000 U/ml	CA19-9
< 3.2 U/ml	850 U/ml	AFP
< 3.2 U/ml	1300 ng/ml	CEA

## ۶) تداخل :

جهت بررسی تداخل کیت به سه نمونه سرم مقادیر زیر از عوامل مداخله گر هموگلوبین ، تری گلیسرید و بیلی روبین اضافه و تغییرات میزان ارزش نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد .

تفاوت نتایج (%)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر (U/ml)	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (U/ml)	غلظت آنالیت مداخله گر	آنالیت مداخله گر
-0.5 2.7 -1.2	18.2 44.8 479	18.3 43.6 485	1 mg/ml	هموگلوبین
4.3 -2 0.9	19.1 42.7 489.7	18.3 43.6 485	3000 mg/dL	تری گلیسرید
2.1 -3.8 1	18.7 41.9 480	18.3 43.6 485	20 mg/dL	بیلی روبین

بر اساس نتایج بدست آمده تداخل ایجاد شده تغییر چشمگیری در نتایج ایجاد نکرد و قابل قبول می باشد .

## ۷) اثر هوک ( Hook Effect ) :

آزمایش CA15-3 در سرمهائی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت ( تا 60000 U/ml ) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

## References:

1. Li M, Men X, Zhang X. Diagnostic value of carbohydrate antigen 72-4 combined with carbohydrate antigen 15.3 in ovarian cancer, cervical cancer and endometrial cancer. *JBUON*. 2020; 25(4): 1918-1927.
2. Gaughran G, Aggarwal N, Shadbolt B, Stuart-Harris R. The utility of the tumor markers CA15.3, CEA, CA-125 and CA19.9 in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Manag*. 2020; 9 (4): 95-102.
3. Yang Y, Zhang H, Zhang M, Meng Q, Cai L, Zhang Q. Elevation of serum CEA and CA15-3 levels during antitumor therapy predicts poor therapeutic response in advanced breast cancer patients. *Oncol Lett*. 2017 ; 14 (6): 7549-7556.
4. Assad DX, Porto Mascarenhas EC, Costa Normando AG, Chardin H .Correlation between salivary and serum CA15-3 concentrations in patients with breast cancer. *Mol Clin Oncol*. 2020 ; 13 (2):155-161.
5. Incoronato M, Mirabelli P, Catalano O, Aiello M, Parente C, Soricelli A et al. CA15-3 is a useful serum tumor marker for diagnostic integration of hybrid positron emission tomography with integrated computed tomography during follow-up of breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2014; 14 (1): 356.
6. Pedersen AC, Sørensen PD, Jacobsen EH, Madsen JS, Brandslund I. Sensitivity of CA 15-3, CEA and serum HER2 in the early detection of recurrence of breast cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 51 (7): 1511-1519.
7. Tampellini M, Berruti A, Gorzegno G, Bitossi R, Bottini A, Durando A et al. The significance of CA15-3 in breast cancer patients and its relationship to HER-2 receptor status. *Int J Immunopathol Pharmacol*.2014; 27(1):45-51.
8. Shao Y, Sun X, He Y, Liu C, Liu H. Elevated levels of serum tumor markers CEA and CA15-3 are prognostic parameters for different molecular subtypes of breast cancer. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0133830.
9. Li X, Dai D, Chen B, Tang H, Xie X, Wei W. Clinic pathological and Prognostic Significance of Cancer Antigen 15-3 and Carcinoembryonic Antigen in Breast Cancer: Disease marker.2018; <https://doi.org/10.1155/2018/9863092>.
10. Tampellini M, Berruti A, Bitossi R, Gorzegno G, Alabiso I, Bottini A et al. Prognostic significance of changes in CA 15-3 serum levels during chemotherapy in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2006. 98 (3): 241-248

Y

### روش انجام آزمایش CA15-3 بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد CA15-3			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
اسی یافر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
استانداردها	۲۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۲۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۲۰ میکرولیتر
<p>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 .</p>			
آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>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 .</p>			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .</p>			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر ( و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .</p>			