کیت اندازه‌گیری
Carcinoembryonic Antigen (CEA)
در سرم انسان
CEA ELISA Kit 96t Cat. NO: 1024-96

Brochure Rev: 18 (1399/04/03)

مقدمه:

آنتی‌ژن Carcinoembryonic یا CEA یک گلیکوپروتئین ۲۰۰ کیلو دالتونی سطح سلولی است. در سال ۱۹۶۹ گزارشی منتشر شد مبنی بر اینکه CEA پلاسما در ۳۵ مورد از ۳۶ بیمار مبتلا به آدنوکارسینومای کولون بالا رفته و پس از انجام جراحی‌های موفقیت‌آمیز پایین آمده است. اگرچه CEA معمولا با سرطان کولورکتال (CRC) مرتبط است ولی مقادیر بالای آن در بسیاری از سرطان‌ها نظیر ریه، معده، پانکراس، پستان، تخمدان و سایر اندام‌ها نیز گزارش شده است. همچنین در برخی از بیماری‌های خوش‌خیم نظیر التهاب دستگاه گوارش و ریه و سرطان خوش‌خیم کبد و در افراد سیگاری نیز سطح CEA افزایش می‌یابد. افزایش مقادیر CEA سرم با مرحله و فاز گسترش بیماری، درجه تمایز تومور و مکان متاستاز در ارتباط است.

اصول آزمایش:

در این روش، تثبیت و بی‌حرکت سازی کمپلکس‌های ایمنی در سطح چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کوت شده در کف پلیت و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CEA بیوتینیله شده صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ محلولی تشکیل می‌شود.

به موازات واکنش فوق، کمپلکس ایمنی ساندویچ به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح پلیت متصل می‌شود. میزان تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و فعالیت آنزیم، با غلظت CEA سرم ارتباط مستقیم دارد. پس از تخلیه چاهک‌ها و شستشوی اجزاء متصل نشده، سوبسترای آنزیم HRP (محلول رنگزا) درون آنها ریخته می‌شود و محصول آبی رنگی تولید می‌شود که با افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت CEA سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت CEA سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.

۲. کالیبراتورهای CEA در مقادیر ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۲۵۰ ng/ml تهیه شده در سرم انسان.

۳. کونژوگه CEA: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP در بافر است.

۴. محلول شستشو (۵۰ x): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.

۵. محلول رنگزا A: ۱ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

۶. محلول رنگزا B: ۱ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

۷. محلول متوقف کننده واکنش: ۱ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

۸ محلول کنترل: ۱ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.

۹. برچسب مخصوص پلیت ۱ ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.

۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.

۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.

۴. محتویات کیت منبع انسانی دارد. مواد مورد استفاده برای تولید این کیت از نظر منفی بودن HBsAg، HIV 1/2 و HCV تست شده‌اند. در هر حال هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها باید طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است.

۶. در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شده و به سرعت سرم از سلول‌ها جدا گردد.

توجه: از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.

۲. درب ظروف نمونه باید کاملا بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

محلول شستشو: کل محتویات ویال محلول شستشو (۵۰X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق پس از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه کالیبراتورها، معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند.

کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمایید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهدارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و محلول کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Conjugate Enzyme) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه (±۱۰ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

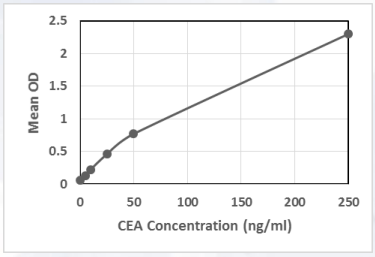
۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول زنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول زنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۸ ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۹. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.056	0.053	0
	B1	0.050		
Cal B	C1	0.138	0.132	5
	D1	0.127		
Cal C	E1	0.214	0.223	10
	F1	0.233		
Cal D	G1	0.450	0.458	25
	H1	0.466		
Cal E	A2	0.748	0.770	50
	B2	0.792		
Cal F	C2	2.276	2.302	250
	D2	2.328		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای CEA

Expected Value
Non Smokers < 5 ng/ml
Smokers < 10 ng/ml

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean CEA (ng/ml)	4.36	8.9	15.2
S.D (ng/ml)	0.24	0.41	0.72
C.V (%)	5.5	4.6	4.7

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام پذیرفت.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	15	15	15
Mean CEA (ng/ml)	3.5	9.8	18.3
S.D. (ng/ml)	0.24	0.73	0.92
C.V (%)	6.8	7.4	5

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت CEA در آن اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample (ng/ml)	Added (ng/ml)	Exp. (ng/ml)	Obs. (ng/ml)	Rec. (%)
1	4.9	8.1	6.5	6.4	98.5
2	7.3	17.6	12.45	12.13	98.6
3	11.9	26.7	19.3	20.1	104.1
4	25.3	46.2	35.75	37.5	104.9

Linearity

در این تست غلظت CEA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Recovery %			
1	18.9	97.1	99.5	97.3	98
2	23.5	98.8	99.4	101.4	97.7
3	36.3	103.6	95.3	98.2	99.5
4	47.3	99.5	101.5	97.8	99.1

Specificity

اختصاصیت این آزمایش با کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز CEA مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب مورد سنجش قرار گرفت.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
Acetylsalicylic Acid	1	100µg/ml
Ascorbic Acid	<0.0001	100µg/ml
Caffeine	<0.0001	100µg/ml
AFP	<0.0001	10µg/ml
PSA	<0.0001	1.0µg/ml
CA-125	<0.0001	10.000 U/ml
hCG	<0.0001	1000 IU/ml
hLH	<0.0001	10 IU/ml
hTSH	<0.0001	100 mIU/ml
hPRL	<0.0001	100 µg/ml

Hook effect

در بررسی اثر هوک CEA تا غلظت ۶۰۰۰۰ ng/ml بررسی گردید که اثر هوک مشاهده نشد.

Sensitivity

بر اساس جمع معدل جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۱/۱ ng/ml می‌باشد.

References:

1. Engall, E., Methods in Enzymology, Volume 70, Van Vunakis, H.and Langone, J. J. (eds.), Academic Press, New York, 419-492 (1980).
2. Gold P, Freedman S O. Demonstration of tumor specific antigen inhuman colonic carcinoma by immunologic tolerance and absorptiontechniques. J Exp Med; 127: 439-462 (1965).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

●www.idealdiag.com●
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹