

کیت سنجش HE4 به روش الایزا

حیطه کاربرد: کیت الایزای HE4 پیش‌تاز طب، برای سنجش کمی HE4 در سرم انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی و پیگیری اثربخشی درمان در بیماران سرطان تخمدان به کار می‌رود. محتوی این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می‌باشد.

مقدمه:

پروتئین اپیدیم انسانی (HE4) برای اولین بار در اپی تلیوم دستگاه تناسلی شناسایی شد که به عنوان مهار کننده پروتئاز در فرایند بلوغ اسپرم ایفای نقش می‌کند. بیان گلیکوپروتئین HE4 به شدت محدود به بافتهای نرمال اپی تلیوم دستگاه تناسلی و تنفسی می‌باشد. در حالی که HE4 ترشحاتی در مقادیر بالا در سرم بیماران مبتلا به سرطان تخمدان یافت می‌شود. بیان HE4 در ۹۳٪ کارسینومای اپی تلیال سروزی و ۱۰۰٪ کارسینومای اپی تلیال آندومتر مشاهده می‌شود درحالی که تنها ۵۰٪ کارسینومای Clear-cell و ۲۰٪ تومورهای موسینی تخمدان مثبت هستند. در سال ۲۰۱۱ تاییدیه FDA برای استفاده HE4 برای پیگیری درمان و نظارت بر عود بیماری در خانمهای دارای توده سرطانی تخمدان صادر شد. مهمترین برتری HE4 این است که برخلاف CA125 در اندومتریوز افزایش نمی‌یابد. این مساله باعث شد ترکیب HE4 و CA125 برای تعیین الگوریتم ریسک بدخیمی تخمدان با نام ROMA استفاده شود. در خانمهای یائسه غلظت HE4 سرمی به عنوان شاخص ارزشمندی برای تمایز کارسینومای اپی تلیال تخمدان از توده های خوش خیم تخمدان محسوب می‌شود. بعلاوه ثابت شده است که ترکیب HE4 و CA125 می‌تواند کارآمدی CA125 را بهبود ببخشد. جالب توجه است که سطوح بالای HE4 در بیش از نیمی از بیماران سرطان تخمدان که CA125 آنها افزایش نداشته است، قابل سنجش است. بنابراین ترکیب این دو مارکر به مقدار اندکی حساسیت تشخیصی در سرطان تخمدان را بهبود می‌بخشد. مهمترین کاربرد ثابت شده HE4 در پیگیری پس از درمان بیماران سرطان تخمدان و نظارت بر عود بیماری می‌باشد. در این مورد اندازه گیری HE4 مکمل سنجش CA125 و تسهیل کننده پیگیری درمان بیمارانی است که قبل از درمان CA125 منفی یا پایین داشته اند. از این رو کیت الایزای HE4 پیش‌تاز طب می‌تواند به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی و پیگیری اثربخشی درمان در بیماران سرطان تخمدان به کار برده شود.

اساس آزمایش:

اساس کیت کمی سنجش HE4 به روش الایزای ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می‌باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی مونوکلونال علیه یکی از شاخصهای آنتی ژنیک HE4 پوشش داده می‌شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده، پس از انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد HE4 متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می‌گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت HE4 در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) و کروموژن است داخل چاهکها ریخته می‌شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود 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 HE4.
- ۲) محلول اسی بافر (Assay Buffer): یک ویال ۱۲ 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 HE4 متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده برای مصرف - قرمز رنگ).
- ۴) سری استانداردها (Standards Set): شامل ۶ ویال از استانداردها با غلظتهای صفر، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ pmol/L از HE4 (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می‌باشند) (آماده برای مصرف - بنفش رنگ).

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

ویرایش اول - آذر ۹۹



- ۵) سرم کنترل پایین (Low Control Serum): یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص HE4 رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف - زرد 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 HE4 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 تترا متیل 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 ۲۰ 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 الیزاید ردارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس)
- ۲) سمپلر های دقیق و کالیبره ۲۰ 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 HE4 در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است.
- ۵) از مخلوط کردن محتویات کیت ها 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 بیماران، استانداردها، کنترل ها و چاهک های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلول های واکنش گر و معرف ها 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 سانتیگراد 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 بصورت 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) ۲۰ 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. استانداردها، سرم های کنترل و نمونه ها را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید؛
- شش 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) ۱۰۰ 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 چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنانچه دستگاه واشر 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 ۸۰۰ pmol/L به ترتیب کمتر از ۰/۱ و بیشتر از ۱/۶ قابل قبول است .

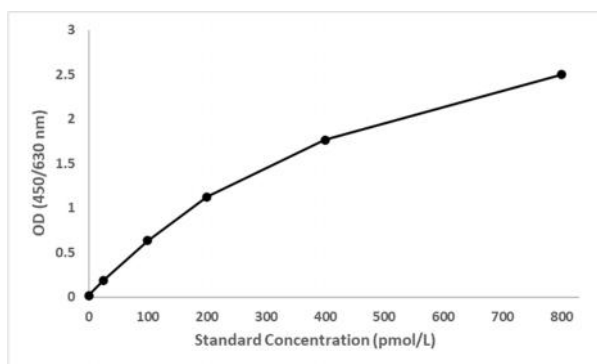
استانداردها (pmol/L)	جذب نوری (450/630nm)
0	<0.1
800	>1.6

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 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 .

HE4 Standard Curve

استانداردها (pmol/L)	جذب نوری (450/630nm)
0	0.019
25	0.19
100	0.64
200	1.12
400	1.77
800	2.50



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:

مقادیر سرمی HE4 در 238 خانم سالم اندازه گیری شد. میانگین داده ها 49.7 pmol/L (حدود اطمینان 95% 47.2-52.2) با انحراف معیار 19.7 pmol/L محاسبه شد. در این مطالعه 98% افراد مقدار HE4 کمتر از 120 pmol/L داشتند.

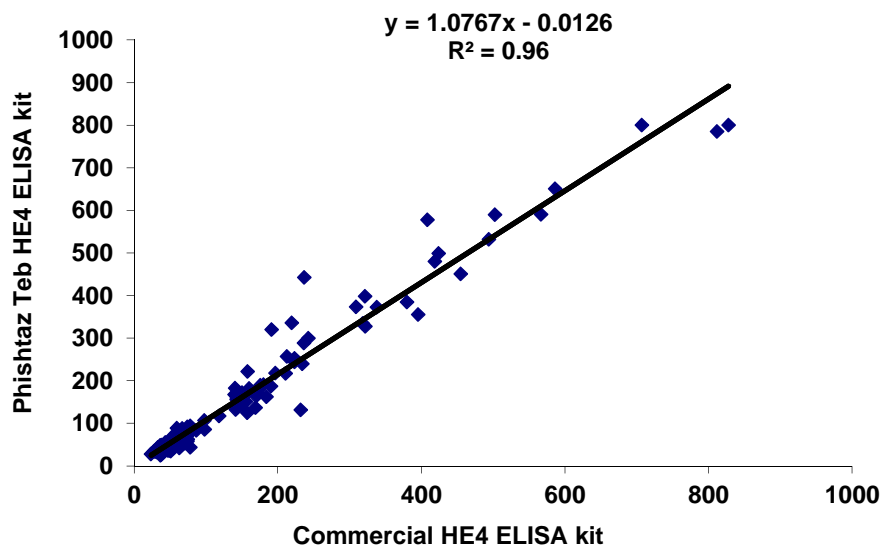
محدودیت های روش اندازه گیری:

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 هتروفلیک 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:

(1) مطالعه مقایسه ای:

کیت سنجش HE4 شرکت پیش‌تاز‌تیب با کیت تجاری مربوطه مقایسه شد. نمونه های سرم 127 بیمار با تشخیص قطعی سرطان تخمدان خوش خیم و بدخیم مراجعه کننده به یکی از بیمارستانهای ریفال انکولوژی برای تستهای مقایسه ای استفاده شدند. نتایج تستهای مقایسه ای بروی نمونه های ذکر شده بیانگر همبستگی 98% بین کیت پیش‌تاز‌تیب و کیت تجاری معتبر بود.



۲) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر مبنای جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) مرز شاهد (LoB) در این کیت 0.26 pmol/L می باشد. بر اساس جذب نوری نمونه با غلظت پایین آنالیت (5 pmol/L) و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت قابل تشخیص HE4 در این کیت 5.46 pmol/L 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) بوسیله سه نمونه سرمی با غلظتهای متفاوت HE4 انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است.

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

CV %	SD (pmol/L)	میانگین (pmol/L)	تعداد دفعات تکرار تست	
3.74	1.96	52.37	20	نمونه ۱
2.23	7.63	341.46	20	نمونه ۲
3.43	20.84	608.04	20	نمونه ۳

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

CV %	SD (pmol/L)	میانگین (pmol/L)	تعداد دفعات تکرار تست	
7.42	3.31	44.63	20	نمونه ۱
3.98	14.40	362.13	20	نمونه ۲
5.03	32.73	650.10	20	نمونه ۳

۴) ریکاوری آزمایش :

مقادیر مشخصی از HE4 به سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از HE4 افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

* جهت تست ریکاوری از استانداردهای کیت استفاده نشود .

جدول ریکاوری :

ریکاوری (%)	مقدار بدست آمده (pmol/L)	مقدار مورد انتظار (pmol/L)	مقدار HE4 افزوده شده (pmol/L)	مقدار HE4 موجود در سرم (pmol/L)	نمونه
91.82	94.55	102.98	146.05	59.90	1
92.84	185.10	199.38	338.85	59.90	1
103.20	357.59	346.50	633.10	59.90	1
90.60	188.02	207.53	146.05	269.00	2
96.82	294.25	303.93	338.85	269.00	2
95.80	432.10	451.05	633.10	269.00	2
90.16	279.00	309.45	146.05	472.85	3
85.62	347.49	405.85	338.85	472.85	3
96.23	532.15	552.98	633.10	472.85	3

۵) خطی بودن آزمایش :

برای تایید خطی بودن تست رفتهای سریالی از ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از HE4 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت و درصد ریکاوری محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

ریکاوری (%)				مقدار HE4 موجود در سرم رقیق نشده (pmol/L)	نمونه
رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
95.70	98.76	107.01	95.65	147.2	1
91.32	97.54	92.27	101.23	313.47	2
97.58	101.23	90.68	106.08	610.17	3

۶) اثر هوک (Hook Effect):

آزمایش HE4 جهت سرم های با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا 30000 pmol/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

۷) واکنش متقاطع :

واکنش متقاطعی با آنتی ژن های CA125 و CEA, AFP, PSA, CA19.9, CA15-3 مشاهده نشد .

References:

Kumarasamy C, Madhav MR, Sabarimurugan S, Lakhotiya K. et al. Diagnostic and prognostic role of HE4 expression in multiple carcinomas, *Medicine*. 2019;98(28):pe15336.

Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod*. 1998; 3:86-95.

Gentry-Maharaj A, Burnell M, Dilley J, et al. Serum HE4 and diagnosis of ovarian cancer in postmenopausal women with adnexal masses. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;222(1):56.e1-56.e17.

Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 2005;65(6):2162-2169.

Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene*. 2002; 21(17):2768-2773.

Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003; 63(13):3695-3700.

Karlsen MA, Høgdall EV, Christensen IJ, et al. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecol Oncol*. 2015;138(3):640-6.

Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer*. 2009;100(8):1315-1319.

Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, et al. Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;116(3):378-383.

روش انجام آزمایش HE4 به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد HE4			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلولها
-	-	۲۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۲۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۲۰ میکرولیتر	-	-	نمونه
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	اسی بافر
<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>			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	آنزیم کنژوگه
<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>			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
<p>۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.</p>			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
<p>جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس) قرائت کنید.</p>			