

肿瘤相关抗原 CA125 定量检测试剂盒

(酶联免疫法)

CanAg CA125 EIA

产品编号: 400-10

产品说明书编号: 400-10
2007 年 11 月

酶联免疫试剂盒用于体外诊断
规格: 96 人份/盒

用途

CanAg CA125 EIA 试剂盒用于定量检测人血清中 CA125 的含量。

检测方法说明

CA125 是一种高分子量的粘蛋白型糖蛋白, 最初是由 Bast 等人建立的 0c125 单克隆抗体命名的。现已表明, 在 CA125 抗原上的不同表位可同时表达 0c125 单抗系列的识别位点, 故可应于建立针对 CA125 抗原不同位点的检测方法。

CanAg CA125 EIA 试剂盒是建立在两株鼠单克隆抗体的基础上, 0v197 和 0v185, 它们直接结合 CA125 抗原蛋白核心的两个独立位点。

实验原理

CanAg CA125 EIA 试剂盒采用直接夹心技术基础上的固相、非竞争性检测法。标准品, 质控品, 病人标本与生物素标记的抗 CA125 抗体以及辣根过氧化物酶标记的抗 CA125 示踪液, 在链亲和素包被的微孔中一起温育。清洗后, 加入底物/显色缓冲液(过氧化氢和 3, 3', 5, 5' 四甲基联苯胺)使其发生酶反应。如果血清中存在抗原, 就会显示为蓝色。颜色的深度与标本中的 CA125 浓度呈正比。

颜色的深度可用酶标仪在 620nm (也可选择加入终止液后在 405 nm)进行检测。每次试验均需根据每个标准液的浓度与其相对应的吸光度绘制标准曲线, 病人标本中的 CA125 浓度即可从标准曲线上读出。

试剂

- CanAg CA125 EIA 试剂盒能检测 96 人份标本。
- 试剂盒的有效期标示于包装盒外标签上。
- 禁止使用过期的试剂。
- 不同批号的试剂禁止混用。
- 试剂盒贮于+ 2℃至+ 8℃贮存, 避免冷冻。
- 打开包装的试剂其稳定性如下表, 避免污染。试剂使用后, 用原包装密封好试剂并立即于+ 2℃至+ 8℃贮存。

组分	含量	第一次开封后试剂的贮存和稳定															
微孔板 链亲和素包被的微孔板 1 个 + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期 12×8, 链亲和素包被的微孔板, 可拆分。打开包装后, 应立即将未用的微孔板条放入装有干燥剂的铝箔袋中, 密封并保持干燥。																	
CA125 标准品 5 瓶 + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期 <table> <tr> <td>CA125 0</td><td>0U/ml</td><td>1×8ml</td></tr> <tr> <td>CA125 10</td><td>10U/ml</td><td>1×0.75ml</td></tr> <tr> <td>CA125 40</td><td>40U/ml</td><td>1×0.75ml</td></tr> <tr> <td>CA125 200</td><td>200U/ml</td><td>1×0.75ml</td></tr> <tr> <td>CA125 500</td><td>500U/ml</td><td>1×0.75ml</td></tr> </table> 直接使用, 保存在 Tris-盐酸缓冲液中, 内含牛血清白蛋白, 去污剂, 惰性黄染料及作为防腐剂的 0.05 % 叠氮钠。标准品 0 可用来稀释血清标本。			CA125 0	0U/ml	1×8ml	CA125 10	10U/ml	1×0.75ml	CA125 40	40U/ml	1×0.75ml	CA125 200	200U/ml	1×0.75ml	CA125 500	500U/ml	1×0.75ml
CA125 0	0U/ml	1×8ml															
CA125 10	10U/ml	1×0.75ml															
CA125 40	40U/ml	1×0.75ml															
CA125 200	200U/ml	1×0.75ml															
CA125 500	500U/ml	1×0.75ml															
CA125 质控品 2 瓶 + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期 <table> <tr> <td>质控品</td><td>1</td><td>1×0.75ml</td></tr> <tr> <td>质控品</td><td>2</td><td>1×0.75ml</td></tr> </table> 直接使用, 保存在 Tris-盐酸缓冲液中, 内含牛血清白蛋白, 去污剂, 作为防腐剂的 0.05 % 叠氮钠。			质控品	1	1×0.75ml	质控品	2	1×0.75ml									
质控品	1	1×0.75ml															
质控品	2	1×0.75ml															
生物素 抗-CA125 生物素标记的抗-CA125 1×15ml + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期 生物素标记的抗 CA125 鼠单克隆抗体, 浓度约为 2ug/ml。其中含磷酸盐缓冲液 (pH 7.75), 牛血清白蛋白, 封闭剂, 去污剂, 惰性红染料及作为防腐剂的 0.05 % 叠氮钠。																	
酶结合物 抗-CA125 示踪液, HRP 标记的抗-CA125 1×0.75ml + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期 含 HRP 标记的鼠抗 CA125 单克隆抗体的浓缩液, 浓度约为 30ug/ml。使用前用示踪缓冲液稀释。																	
DIL CONJ 示踪缓冲液 1×15ml + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期 直接使用, 保存在磷酸盐缓冲液中 (pH 7.2), 内含牛血清白蛋白, 去污剂, 惰性蓝染料及作为防腐剂的 0.01 % 甲基-异噻唑酮(MIT)。																	
底物液 TMB																	

TMB HRP-底物液 $1 \times 12\text{ml}$ + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期
直接使用。含过氧化氢缓冲液和 3,3',5,5' 四甲基联苯胺 (TMB)。

终止液

终止液 $1 \times 15\text{ml}$ + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期
直接使用。含 0.12 M 盐酸。

清洗液

25×

清洗浓缩液 $1 \times 50\text{ml}$ + 2℃至+ 8℃贮存稳定至失效期
使用前 25 倍稀释。此溶液为吐温 20 的 Tris-Hcl, Germall II 作为防腐剂。

不稳定性说明

TMB HRP 缓冲液应该为无色或呈很浅的蓝色。溶液完全变为蓝色则提示试剂被污染了, 应丢弃, 禁止使用。

警示

仅供体外诊断用

- 仅供专业使用。
- 请参照美国健康和人类服务部 (Bethesda, Md, USA) 公布的出版号为 (CDC) 88-8395 的有关实验室安全和其他地区与国家的相应规定。
- 患者标本应视为潜在传染物进行处理。
- 参照当地的废物处理原则进行废物处理。

注意

用于制备人源试剂的每一个献血员都通过检测, HBsAg、抗 HCV、抗 HIV-1 和抗 HIV-2 抗体均为阴性。但是没有一种方法能完全排除血清中不存在病原体, 因此试剂盒中含人源的组分都应被视作潜在传染源。

标本的收集与处理

CanAg CA125 EIA 试剂盒用于检测血清标本。静脉穿刺采血, 常规分离血清 (可室温下静置 20-30 分钟或 800-1000rpm 离心 10 分钟)。标本在+ 2℃至+ 8℃可贮存 24 小时, 在-70℃可长期保存。冷冻仅限一次。冷冻标本可在+ 2℃至+ 8℃过夜缓融。检测前将标本恢复到室温。

操作程序

本试剂盒未提供的一些必需品

1. 微板振荡器

振荡强度应从弱到强。纵向振动约 200 次/分钟, 摆动 700-900 次/分钟。

2. 洗板机

带有一个真空泵或喷水真空泵和一个回水槽或半自动微孔板清洗，可循环清洗 1 次及 6 次的自动清洗器。如果没有全自动洗板机，推荐 Nunc Immuno-8 手动洗板机。

3. 酶标仪

波长 620 nm 和/或 405 nm, 可读吸光度范围 0 – 3.0 的酶标仪。

4. 精密移液器

用一次性塑料吸头的可移液 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L 及 1ml 的精密移液器。最好使用 8 道的 100 μ L 精密移液器，但非必需。

5. 蒸馏水或去离子水

用于配制清洗液。

操作程序注意事项

1. 要完全理解产品说明书，以保证正确使用 CanAg CA125 EIA 试剂盒。试剂盒中提供完整的一套试剂。
2. 检测前试剂应有有效的平衡到室温（20℃至 25℃）。为保证结果的准确，实验操作应在室温（20℃至 25℃）进行检测。冷冻血清化冻后应轻轻摇匀。
3. 在开始滴加标准液和患者标本前，建议在微孔板条上作记号以便在实验中或实验完成后能清楚的分清每一份标本。
4. 细心的清洗微孔板是必须的。要确保每孔都完全注满清洗液，抽吸要彻底，抽吸后要使孔底干燥。如果孔中有残留液体，应将微孔板翻过来在吸水纸上轻轻地拍打。
自动洗板机：参照仪器说明进行操作，每步孵育后按要求冲洗所需的次数。
清洗液不宜长时间滞留于洗板装置中，以免针头堵塞。
5. 用洁净的一次性吸头吸取 TMB HRP 底物液。如果要从试剂瓶中量取 TMB HRP 底物液，使用洁净的容器或一次性塑料器皿以避免试剂污染。TMB HRP 底物液应是无色或轻微蓝色。蓝色表明试剂已被污染应丢弃。
6. 在处理标本和试剂过程中，要使用正确的加样技术。使移液器的吸头稍高于孔的平面，不要触及微孔板或孔中的液体，以避免液体从一孔带入另一孔。在加入 TMB HRP 底物液时，正确的加样技术尤为重要。

配制试剂		配制试剂的稳定性
清洗液		+ 2℃至+ 25℃ 在密闭容器中 2 周
将 50ml 浓缩的清洗液倒入洁净的容器中，加入 1200ml 蒸馏水或去离子水，25 倍稀释后则为所需的清洗液。		
抗体溶液		+ 2℃至+ 8℃ 3 周
根据所需要的量配制抗体溶液。每条微孔板所需的量为 50 μ l 示踪液（HRP 标记的抗 CA125）和 1ml 生物素标记的抗 CA125 溶液混合。		
板条数	示踪液, HRP 标记的抗 CA125 (μ l)	生物素标记的 CA125 (ml)
1	50	1
2	100	2
3	150	3

4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

确保使用洁净的塑料瓶或玻璃瓶配制抗体液。

替代方法：将示踪液倒入示踪缓冲液小瓶中并轻轻混匀。注意要将示踪液全部倒入示踪缓冲液小瓶中。

注意：稀释好的示踪液可于+ 2℃至+ 8℃存放 3 周。不要配制多于在此期间所能使用的示踪液，并且确保正确贮存示踪液。

检测流程

每次均应复孔检测标准液和患者标本。

每次检测均应绘制标准曲线。

检测前所有的试剂和血清标本均应平衡至室温（+ 20℃至+ 25℃）。

- 按照产品说明书准备清洗液及示踪工作液。使用洁净的容器是非常必要的。
- 将所需的微孔板条移至板条架上（剩余的未使用的板条放回塑料袋中并密封好）。在 30 分钟内用清洗液清洗一次微孔板条。
- 按照以下的加样方案分别滴加 25ul 的 CA125 标准品（CAL 0, 10, 40, 200, 500），CA125 质控品（C1, C2）及患者标本（未知浓度—Unk）至微孔中。

	1	2	3	4	5	6	7etc
A	Cal 0	Cal 500	2 nd Unk				
B	Cal 0	Cal 500	2 nd Unk				
C	Cal 10	C1	etc.				
D	Cal 10	C1					
E	Cal 40	C2					
F	Cal 40	C2					
G	Cal 200	1 st Unk					
H	Cal 200	1 st Unk					

- 用 100ul 精密移液器（或 8 道 100 ul 精密移液器）吸取 100ul 生物素标记的抗 CA125 抗体加入每一孔中。
精密移液器的吸头要稍高于孔的底端，避免触及塑料微孔或液面。
- 微孔板振荡器上室温（+ 20℃至+ 25℃）振荡反应 2 小时（±10 分钟）。
- 温育后将孔内液体吸干，清洗 3 次。按照操作程序注意事项中第四步所描述的清洗方法进行。
- 同步骤 4，每孔中加入 100ul 示踪工作液。
- 微孔板振荡器上室温（+ 20℃至+ 25℃）振荡反应 1 小时（±5 分钟）。
- 温育后将孔内液体吸干，清洗 6 次。按照操作程序注意事项中第四步所描述的清洗方法进行。
- 同步骤 4，每孔中加入 100ul TMB HRP-底物液。加液速度越快越好，从第一孔到最后一孔的加液时间不要

超过 5 分钟。

11. 微孔板振荡器上室温（+ 20℃至+ 25℃）闭光振荡反应 30 分钟（±5 分钟）。

12. 立刻在 620nm 的酶标仪上测定吸光度。

替代方法

如果实验室的酶标仪不能测定 620nm，可选择以下步骤测定。

12. 加入 100ulHRP 终止液，15 分钟内在酶标仪 405nm 测定吸光度。

检测范围

CanAg CA125 EIA 检测试剂盒的检测范围为 1.5–500U/ml。如果 CA125 的浓度高于检测范围，推荐采用标准品 0 稀释标本后再检测。

质量控制

建议使用内部质控品以确保每次检测结果的准确性，每个质控品的可接受范围标示在瓶子的标签上。如果质控品的值超出了标示的范围，应确认试剂和酶标仪是否正确，并重新试验。推荐实验室建立自己的不同水平的血清库作为内部质控品。

参考品

由于没有适合于 CA125 抗原的标准的参考品，我公司建立了一套自己的室内质控标准品来标定 CanAg CA125 EIA 检测试剂盒中的标准品的值。

结果计算

最好使用能进行数据处理的酶标仪。根据 CA125 标准品的浓度建立一个程序。

推荐采用下列方法之一进行 CA125 自动结果计算：

- 3 次方拟合曲线法，标准曲线应包括标准品 0（0U/ml）。
- 拟合平滑曲线法，标准液品 0（0U/ml）应作为微孔板的空白对照。
- 点对点内插估算法，标准曲线应包括标准品 0（0U/ml）。
- 二项式拟合曲线法，标准曲线应包括标准品 0（0U/ml）。

注意：不能采用 4 参数或线性回归的计算方法。

手工计算方法：用 CA125 标准品的浓度（U/ml）与其对应的吸光度（A）作标准曲线（见下图）。每个患者标本中的未知的 CA125 浓度可根据其平均光吸收值就可以从标准曲线上读出。

如果初次检验标本的 CA125 浓度值高于标准品 500，则需要用标准品 0 按 1/10 和 1/100 进行稀释以期获得准确的数据。

最终结果应按下列公式计算：

1/10 稀释=50ul 样品+450ul 样品稀释液

1/100 稀释=50ul 1/10 稀释样品+450ul 样品稀释液

未稀释样品中 CA125 的浓度按以下方法计算：

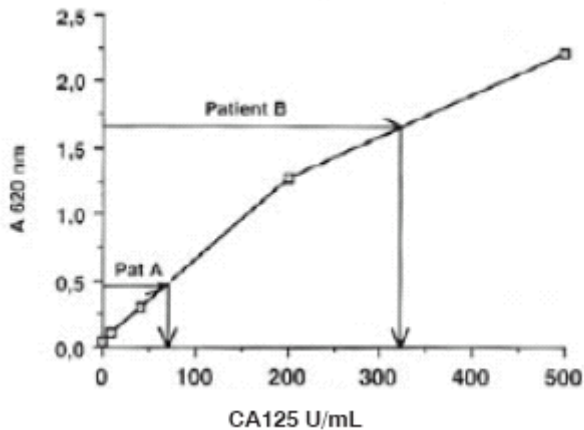
1/10 稀释：10×测定值

1/100 稀释：100×测定值

检测结果示例

标 本	标 准 品 的 值	吸 光 度 均 值 (A)
-----	-----------	---------------

CA125 (U/ml)				
CAL	CA125	0	0U/ml	0.047
CAL	CA125	10	10U/ml	0.116
CAL	CA125	40	40U/ml	0.298
CAL	CA125	200	200U/ml	1.269
CAL	CA125	500	500U/ml	2.218
标本 1				0.490
标本 2				1.650
				69.8
				325



图例（不要根据此曲线计算检测结果）

检测的局限性

CA125 的水平不能用作恶性疾病的存在与否的绝对证据，也不能应用于癌症的筛查。在患者的诊断与治疗中，CA125 的检测结果可以联合其它诊断检测手段，它不能取代任何已存在的临床检查。

尽管试剂盒中的缓冲液含有特异性封闭剂，但是患者标本中的抗-试剂抗体(人抗鼠抗体或嗜异性抗体) 可能会干扰检测。

检测结果的期望值

检测 100 例健康女性献血员，检测平均值为 14.7 U/ml, 标准偏差为 7.7。中间值为 13.1 U/ml, 检测范围为 5.06—47.9 U/ml 对于正常检测值范围的最低值和最高值，其置信区间按照 IFCC 推荐的非参数方法统计获得。参考值的区间涵盖了其中间 95%的部分，因此参考范围按照 2.5%（低值）和 97.5%（高值）为分界点，该范围在参考值分布的两个尾端各去除了 2.5%，非参数方法统计：

分界点	参考范围(U/ml)
-----	------------

2.5 th (低值)	5
97.5 th (高值)	39

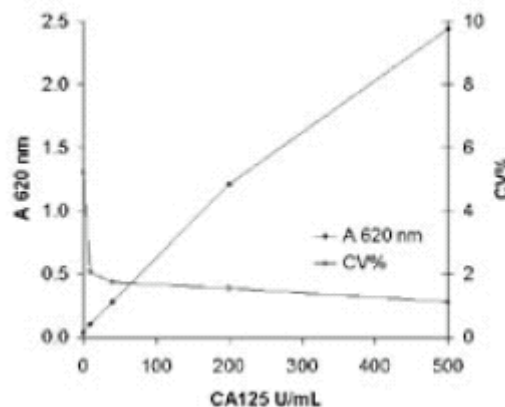
96%的健康女性的检测值低于 35U/ml.

考虑到当地的环境因素如饮食, 气候, 居住条件及患者的选择等, 建议每一个实验室建立自己的正常参考范围。同时, 我们也应该建立这样的概念就是每一个患者自身的基线结果为标志物结果的解释提供了最重要的参考点(6)。

检测特征

剂量反应和精密度图

下图为 CanAg CA125 EIA 试剂盒的典型标准曲线和精密度图。精密度图是在一块微孔板上用标准品随机加样重复 11 次所获得的结果。



精密度

总精密度是按照 NCCLS 指南 EP5-A⁽⁸⁾ 要求, 采用 4 份冷冻人血清标本, 其中含有预先加入不同浓度的 CA125 抗原。每份标本复孔随机加样, 在 10 天内每天 2 次进行检测。

总精密度的检测由不少于 3 位技师, 使用 10 个不同批号的试剂盒在 8 个月内按此方法进行检测。

标本	重复次数	均值 U/ml	同一批号的 标准差(U/ml)	同一批号的 重复性%	不同天的 标准差(U/ml)	不同天的 重复性%
CA1251	40	16.8	0.74	4.4	0.53	3.1
CA1252	40	75.7	3.26	4.3	2.42	3.2
CA1253	40	201	8.55	4.3	7.58	3.8
CA1254	40	392	11.4	2.9	15.5	4.0

检测范围

CanAg CA125 EIA 试剂盒的检测范围为<1.5U/ml。检测范围的定义是根据 CA125 标准品 0 的平均吸光度值所对应的浓度值, 加上 2 倍标准偏差计算所得。计算公式为: $\bar{x} + 2 \times SD$

回收率

将不同浓度的 CA125 抗原加入到正常人血清中, 通过检测计算回收率。抗原的回收率范围为 100±15%。

倒钩效应

CA125 浓度达到 50000U/ml 时无倒钩效应。**注意：**高浓度的标本，在底物反应的颜色将由蓝色变为绿色（在浓度极高的标本中甚至变为黄色），这将导致 620nm 波长的吸光度值为错误的低吸光度值。浓度极高的标本，其吸光度值将落到标准曲线以外，就像倒钩效应一样。

线性

用 CA125 标准品 0 系列稀释病人标本后进行检测，检测值为期望值的 $100 \pm 15\%$ 。

特异性

CanAg CA125 EIA 试剂盒是建立在两株鼠单克隆抗体的基础上，Ov197 和 Ov185，它们直接结合 CA125 抗原蛋白核心的两个独立位点（4）。NCCLS 指南 EP7-P（8）罗列了可能引起干扰的物质。在相应浓度下的该物质对实验检测未见干扰。

相应浓度（ $\pm 10\%$ ）未见干扰	
脂血 (Intralipid®)	4mg/ml
未结合的胆红素	0.6mg/ml
血色素	5mg/ml

质量保证说明

根据实验操作程序获得实验数据。Fujirebio Diagnostics 公司不建议对实验操作步骤作任何修改。任何修改都有可能影响实验结果。对此 Fujirebio Diagnostics 公司将不承诺对商品稳定性和适应性的保证。

参考文献



1. Bast R., Feeney M., Lazarus H., Nadler L., Colvin R., Knapp R., (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 68: 1331 - 1337.
2. O'Brien T, Raymond L, Bannon G, Ford D, Hardardottir H, Miller F, Quirk J (1991). New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA125 epitope. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1857 - 1864.
3. Nilsson O, Jansson E-L, Dahlen U, Nilsson K, Nustad K, Högberg T, Lindholm L (1994). In: Current Tumor Diagnosis: Applications, Clinical Relevance, Research, Trends. Ed R. Klapdor. Zuckschwerdt Verlag München, pp 401-405.
4. Nustad K. et al., (1996) Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA125 antigen: First report from the ISOBM TD-1 Workshop. *Tumor Biol* 17:196-219.
5. Bonfrer J., Duffy M., Radtke, M., Segurado O., Torre G., van Dalen A., Zwirner M. (1999) Tumor markers in gynaecological cancers-EGTM recommendations. *Anticancer Research* 19:2785-2820.
6. Tuxen M., Sclétormos, G., Rustin, G., Nelstrop A., Dombrowsky, P. (2000) Biological variation and analytical imprecision of CA125 in patients with ovarian cancer. *Scand J Clin Invest* 60:713-722.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. Approved Guideline EP5-A (1999).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation protocol Number 7, Vol. 6, No 13, August (1986).

产品标准: YZB/CanAg-008-2007

进口注册证号: S20030024

CanAg® 是 CanAg Diagnostics 的注册商标

Fujirebio Diagnostics AB

Majnabbe Terminal

SE-414 55 Gothenburg,

Sweden

电话: + 46 31-85 70 30

传真: + 46 31-85 70 40

info@canag.com

www.canag.com

CanAg CA125 EIA 实验操作流程

产品编号: 400-10

10

使用前请将试剂混匀。请按操作说明书中描述的振荡温育条件进行操作。

步骤	瓶/板	操作程序																																							
1. 清洗液的制备	WASHBU 25×	将 50ml 的浓缩清洗液稀释于 1200ml 蒸馏水或去离子水。																																							
示踪工作液的制备	CONJ Anti-CA125	每一板条需将 50ul 示踪液（HRP 标记的抗 CA125）与 1ml 生物素标记的抗 CA125 混匀。																																							
	DIL CONJ	<table> <tr> <th>板条数</th><th>HRP 标记的抗 CA125 (uL)</th><th>生物素标记的抗 CA125 (mL)</th></tr> <tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr> <tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr> <tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr> <tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr> <tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr> <tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr> <tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr> <tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr> </table>	板条数	HRP 标记的抗 CA125 (uL)	生物素标记的抗 CA125 (mL)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9	10	500	10	11	550	11	12	600	12
板条数	HRP 标记的抗 CA125 (uL)	生物素标记的抗 CA125 (mL)																																							
1	50	1																																							
2	100	2																																							
3	150	3																																							
4	200	4																																							
5	250	5																																							
6	300	6																																							
7	350	7																																							
8	400	8																																							
9	450	9																																							
10	500	10																																							
11	550	11																																							
12	600	12																																							
2. 清洗	MICROPLA	用清洗液清洗微孔板 1 次																																							
3. 加样：标准品，质控品和标本	CAL CA125 0,10,40,200,500	25uL/孔																																							
4. 加样：生物素抗-CA125	ANTIBODY SOLUTION	100uL/孔																																							
5. 温育	MICROPLA	室温，振荡温育 2 小时。																																							
6. 清洗	MICROPLA	用清洗液清洗微孔板 3 次。																																							
7. 加样：示踪工作液	TRACERWORKINGSOLUTION	100 uL/孔																																							
8. 温育	MICROPLA	室温，振荡温育 1 小时。																																							
9. 清洗	MICROPLA	用清洗液清洗微孔板 6 次。																																							
10. 加样：TMB HRP 底物	SUBS TMB	100uL/孔																																							
11. 温育	MICROPLA	室温，振荡温育 30 分钟。																																							

12. 读值	MICROPLA	620nm
替代方法		
12. 加样：终止液	STOP	100uL/孔
13. 温育	MICROPLA	室温，振荡温育 1 分钟。
14. 读值	MICROPLA	405nm，15 分钟内读值。