

**НАБОР ИФА**  
**ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ**  
**ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА**  
**МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-1 (TIMP-1)**  
**ЧЕЛОВЕКА**

**BMS2018/ BMS2018TEN, Human TIMP-1 Platinum**  
**ELISA**

Каталог. № : **BMS2018/BMS2018TEN** Методика от **09-07-2012**  
Количество : **96, 10x96** Версия **24**  
Производитель: **Bender MedSystems**  
**GmbH, (Австрия)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для исследовательских целей**  
**Не для использования в диагностических или**  
**терапевтических процедурах**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Данный набор предназначен для количественного определения тканевого ингибитора человеческой металлопротеиназы-1. **Набор предназначен только для исследований и не должен использоваться в диагностических или терапевтических целях.**

**2. ВВЕДЕНИЕ**

См. инструкцию на английском языке.

**3. ПРИНЦИП ТЕСТА**

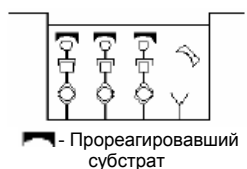
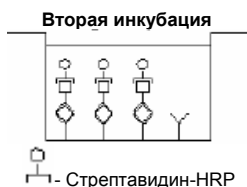
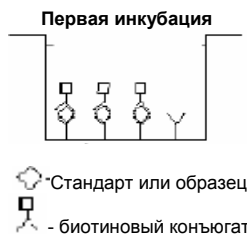
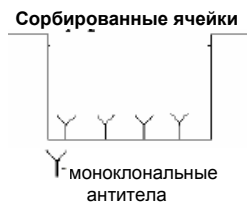
Античеловеческие антитела, покрытые TIMP-1, сорбированы в ячейках планшета.

Человеческий TIMP-1 в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Биотин-конъюгированные античеловеческие TIMP-1 антитела добавляются и связываются с TIMP-1, захваченными первыми антителами.

После инкубации из ячеек удаляются не связавшиеся антитела обнаружения, и в ячейки добавляется Стрептавидин-HRP, который связывается с Антителом TIMP-1.

После второй инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся Стрептавидин-HRP, и в ячейки добавляется субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации TIMP-1, присутствующего в образцах. Концентрация TIMP-1 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.



**4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ**

**4.1 Реагенты в наборе Человеческий TIMP-1 ELISA BMS2018 (96 тестов)**

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому TIMP-1	1 планшет
Антитела Биотин-Конъюгат моноклональных анти-TIMP-1 антител, 70 мкл	1 флакон
Стрептавидин-HRP, 150 мкл	1 флакон
Стандарт, лиофилизированный, 5 нг/мл	2 флакона
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	2 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Красный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	4

**4.2 Реагенты в наборе Человеческий TIMP-1 ELISA BMS2018TEN (10 x 96 тестов)**

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому TIMP-1	10 планшетов
Антитела Биотин-Конъюгат моноклональных анти-TIMP-1 антител, 70 мкл	10 флаконов
Стрептавидин-HRP, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 5 нг/мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	12 флаконов
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	6 флаконов
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Зелёный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Красный краситель, 0,4 мл	6 флаконов
Плётки для заклеивания стрипов	20

**5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА**

Храните компоненты набора при температуре 2-8 °С. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

**6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА**

Супернатант культуры клеток, сыворотка и плазма (ЭДТК, гепарин) были протестированы с помощью этого анализа. Другие биологические образцы могут быть пригодны для использования в анализе. Отделить сыворотку или плазму от сгустка как можно скорее после свертывания.

Обратите внимание на возможный "Хук-эффект" в связи с высокой концентрацией образца (см. главу 11).

Образцы, содержащие видимый осадок, должны быть очищены перед использованием в анализе. Не используйте сильно гемолизированные или липемические образцы.

Образцы должны быть аликвотированы и должны храниться в замороженном виде при -20°С, чтобы избежать потери биологически активного человеческого TIMP-1. Если образцы будут тестироваться в течение 24 часов, они могут храниться при температуре от 2° до 8°С (данные о стабильности образца см. в разделе 13.5).

Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Перед анализом замороженные образцы должны быть доведены до комнатной температуры медленно и осторожным перемешиванием.

**7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, по возможности, фильтром сравнения ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода

- Статистический калькулятор или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

## 8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- Все химикаты считать потенциально опасными. Рекомендуется использование данных реагентов только квалифицированным персоналом в лабораторных условиях. Использовать защитную одежду, очки и перчатки. Избегать контакта с глазами и кожей. В случае контакта, промыть с большим количеством воды.
- Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
- Не пипетируйте ртом.
- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
- При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
- Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
- Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
- Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
- Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
- Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
- Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
- Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °С.
- Жидкие отходы, не содержащие кислоту, и нейтрализованные необходимо смешать с раствором гипохлорита натрия таким образом, чтобы получился в итоге 1% раствор гипохлорита. Оставьте полученную смесь на 30 минут для эффективного обеззараживания. Жидкие отходы, содержащие кислоту, необходимо нейтрализовать до обеззараживания раствором гипохлорита натрия.

## 9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

**Буферные концентраты** привести к комнатной температуре и развести перед началом анализа. Если в **Буферных концентратах** образовались кристаллы, аккуратно подогреть их до полного растворения.

### 9.1 Промывающий раствор (1 x)

Разбавьте 50 мл концентрата дистиллированной или деионизированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 1,0 л. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Промывающий раствор при 2-25 °С. Промывающий раствор стабилен 30 дней.

Промывающий раствор (1 x) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Количество используемых стрипов	Концентрат Промывающего раствора, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

### 9.2 Рабочий буфер (1 x)

Хорошо перемешайте концентрат Рабочего буфера. Разбавьте 5,0 мл концентрата дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания. Храните Рабочий буфер при 2-8 °С. Рабочий буфер стабилен 30 дней.

Рабочий буфер (1 x) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Кол-во стрипов	Концентрат Рабочего Буфера (20x) (мл)	Дистиллированная вода (мл)
1-6	5,0	95,0
1-12	2 x 5,0	2 x 95,0

## 9.3 Биотин-Конъюгат

**Пожалуйста, обратите внимание, что Биотин-Конъюгат следует использовать в течение 30 минут после разведения.**

Провести 1:100 разбавление концентрированного Биотин-Конъюгата Рабочим буфером (1x) в чистой пластиковой пробирке в соответствии со следующей таблицей:

Кол-во стрипов	Биотин-Конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

## 9.4 Стрептавидин-HRP

**Пожалуйста, обратите внимание, что Стрептавидин-HRP следует использовать в течение 30 минут после разведения.**

Провести 1:100 разбавление концентрированного раствора Стрептавидин-HRP с Рабочим буфером (1x) в чистой пластиковой пробирке в соответствии со следующей таблицей:

Кол-во стрипов	Стрептавидин-HRP (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

## 9.5 Стандарт человеческого TIMP-1

Растворите Стандарт TIMP-1 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 5000 пг/мл.

Оставить стандарт для восстановления на 10-30 минут. Хорошо перемешать перед разведениями.

После использования оставшийся стандарт не может храниться и должен быть выброшен.

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10d) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.4.1)

### 9.5.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 7 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

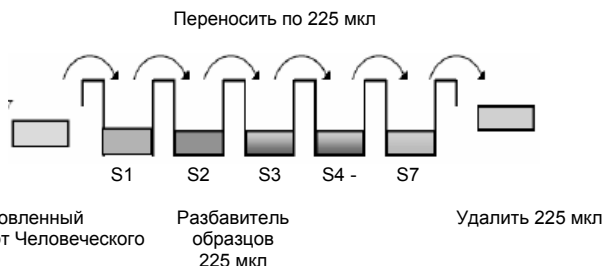
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 5000 пг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 2500 пг/мл).

Пипетировать 225 мкл этого раствора во вторую пробирку, помеченную S2, и тщательно перемешать перед следующим перемещением.

Повторить серийные разведения еще 5 раз, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



## 9.6 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого и красного

Для исключения ошибок в пипетировании при работе с иммуноферментными наборами фирма Bender MedSystems теперь предлагает дополнительное средство для контроля пипетирования даже очень маленьких объемов реагентов – каждый реагент будет отличаться от других цветом.

Эта процедура **необязательна**, она не влияет на результаты анализа и предназначена для облегчения работы лаборанта, поэтому можно этот шаг инструкции пропустить (не выполнять).

Альтернативно, можно использовать основные растворы красителей (**голубой, зелёный, красный**), добавляя их к соответствующему реагенту согласно протоколу (смотри Таблицы ниже).

**1. Разбавитель образцов:** перед разбавлением образцов добавьте **голубой краситель** в соотношении 1:250 (См. Таблицу) в рабочий раствор **Разбавителя образцов (1x)** и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

50 мл Рабочего Буфера (1x)	200 мкл <b>Голубого красителя</b>
100 мл Рабочего Буфера (1x)	400 мкл <b>Голубого красителя</b>

**2. Биотин-Конъюгат:** перед разбавлением концентрата **Биотин-Конъюгата** добавьте **зелёный краситель** в соотношении 1:100 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный биотиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

3 мл Рабочего буфера (1 x)	30 мкл <b>Зеленого красителя</b>
6 мл Рабочего буфера (1 x)	60 мкл <b>Зеленого красителя</b>

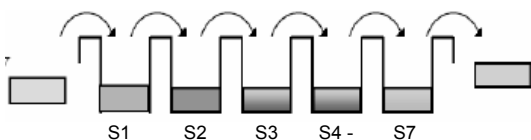
**3. Стрептавидин-HRP:** перед разбавлением концентрата Стрептавидина-HRP добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу, используемому для разбавления конъюгата, окрашенный Anti-Кролик-IgG-HRP используйте согласно инструкции.

6 мл Рабочего буфера (1 x)	24 мкл <b>Красного красителя</b>
12 мл Рабочего буфера (1 x)	48 мкл <b>Красного красителя</b>

## 10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- Предварительно разведите ваши образцы, прежде чем начать с процедурой испытания. Развести образцов сыворотки и плазмы 1:100 Рабочим буфером (1x) в соответствии со следующей схемой:  
10 мкл образца + 990 мкл Буфера для анализа (1x)
- Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. **Неиспользованные стрипы** сразу уберите в пакет с осушителем и храните плотно закрытым при 2-8°C.
- Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера**, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставьте на **10-15 секунд**. Избегайте царапин на поверхности ячеек. Стряхните планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после стряхивания или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевернутом виде. **Не позволяйте ячейкам высыхать!**
- Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разбавление стандарта может быть приготовлено в пробирках): Добавить 100 мкл Рабочего буфера в дублях к всем **стандартам**. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.5) в ячейки A1 и A2 в дублях (См. табл. 1). Перемешайте содержимое ячеек A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из ячейки A1 и A2 в ячейки B1 и B2 соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность ячеек. Повторите перенос и разведение стандартов 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений **Стандарта TIMP-1** в диапазоне от 2500 до 39 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

Переносить по 100 мкл



Восстановленный Стандарт Человеческого TIMP-1      Рабочий буфер 100 мкл      Удалить 100 мкл

При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S7) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

Таблица 1: Схема расположения образцов, бланка и стандартов на планшете.

	1	2	3	4
<b>A</b>	Ст #1 (2500 пг/мл)	Ст #1 (2500 пг/мл)	O 1	O 1
<b>B</b>	Ст #2 (1250 пг/мл)	Ст #2 (1250 пг/мл)	O 2	O 2
<b>C</b>	Ст #3 (625 пг/мл)	Ст #3 (625 пг/мл)	O 3	O 3
<b>D</b>	Ст #4 (313 пг/мл)	Ст #4 (313 пг/мл)	O 4	O 4
<b>E</b>	Ст #5	Ст #5	O 5	O 5

	(156 пг/мл)	(156 пг/мл)		
<b>F</b>	Ст #6 (78 пг/мл)	Ст #6 (78 пг/мл)	O 6	O 6
<b>G</b>	Ст #7 (39 пг/мл)	Ст #7 (39 пг/мл)	O 7	O 7
<b>H</b>	Бланк	Бланк	O 8	O 8

- Внесите по 100 мкл **Рабочего Буфера (1x)** в дубликаты в ячейки «Бланк».
  - Внесите по 80 мкл **Рабочего Буфера (1x)** в ячейки, предназначенные для образцов.
  - Внесите по 20 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
  - Приготовьте **Биотин-Конъюгат** (раздел 9.3).
  - Добавьте по 50 мкл **Биотин-Конъюгата** во все лунки.
  - Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
  - Приготовьте **Стрептавидин-HRP** (раздел 9.4).
  - Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 6 раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
  - Внесите по 100 мкл разбавленного **Стрептавидин-HRP** во все ячейки, включая бланк.
  - п. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
  - Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 6 раза как указано в шаге «с» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
  - Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора ТМБ** во все ячейки.
  - Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут.
- Развитие цвета на планшете должно быть проверено и субстратная реакция остановлена (см. следующий пункт этого протокола) до того, как положительные лунки больше не обнаруживаются. Определение идеального периода времени для проявления цвета должно быть сделано индивидуально для каждого анализа.**

Рекомендуется добавление стоп раствора, когда наивысший стандарт достиг темно-синего цвета. Реакция должна быть остановлена как только Стандарт 1 достиг значения ОП 0.9 – 0.95.

- Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считайте немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8°C в темноте.
- Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательно использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведения стандарта

**Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.**

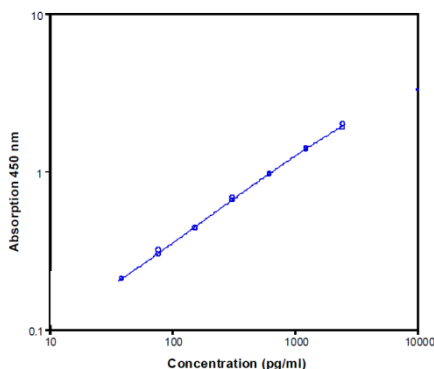
## 11. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации TIMP-1 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации TIMP-1 в образцах из стандартной кривой. Для этого найдите значение на оси ординат (Y) соответствующее среднему значению полученной для каждого образца ОП и проведите горизонтальную линию до пересечения со стандартной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью абсцисс (X). Значение на оси X в точке пересечения и будет соответствовать концентрации TIMP-1 в соответствующей пробе.

- Если инструкции в этом протоколе были соблюдены и образцы были разбавлены 1:500 (20 мкл предварительно разбавленного 1:100 образца + 80 мкл аналитического буфера (1x)) на планшете, концентрация, считанная со стандартной кривой, должна быть умножена на конечный фактор разбавления (x 500).
- Расчет образцов с концентрацией, превышающей стандарт 1, приведет к неправильному, низкому значению человеческого TIMP-1 (Hook-effect). Такие образцы требуют дальнейшего внешнего предварительного разведения в соответствии с ожидаемыми значениями TIMP-1 Рабочим буфером (1x) для того, чтобы точно количественно определить уровни человеческого TIMP-1.
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией TIMP-1. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке ниже. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

**Рисунок.** Пример стандартной кривой для TIMP-1. TIMP-1 был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований.

Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.



**Таблица.** Типичные результаты, полученные с использованием данного набора. Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	TIMP-1, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	250	2.002 1.892	1.947	2.8
2	1250	1.409 1.377	1.393	1.1
3	625	0.978 0.960	0.969	0.9
4	313	0.655 0.683	0.669	2.1
5	156	0.444 0.436	0.440	0.9
6	78	0.318 0.298	0.308	3.3
7	30	0.208 0.211	0.210	0.8
Бланк	0	0.1203 0.118	0.119	0.8

ОП, полученные для стандартов, могут меняться в зависимости от условий выполнения анализа (например, температурный режим).

Кроме того, на протяжении срока годности набора энзиматическая активность, и, следовательно, интенсивность окрашивания, могут изменяться. При этом результаты тестирования остаются достоверными.

## 12. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать между шагами анализа.

- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, использующем мышиные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышиным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышиные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

## 13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация TIMP-1, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 10 пг/мл (среднее 6 независимых определений).

### 13.2 Воспроизводимость

#### 13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сывороток, содержащих различные концентрации TIMP-1. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения TIMP-1 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 4.9 %.

Таблица 3: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации для каждого образца

Образец	Эксперимент	Концентрация TIMP-1, нг/мл	Козфф. Вариации (%)
1	1	230	3.5
	2	232	4.5
	3	242	4.6
2	1	219	4.0
	2	216	2.8
	3	227	5.5
3	1	197	3.8
	2	197	4.7
	3	211	3.0
4	1	99	3.4
	2	102	6.8
	3	103	4.4
5	1	508	6.1
	2	517	2.6
	3	553	7.2
6	1	169	5.9
	2	150	3.7
	3	158	2.7
7	1	197	6.0
	2	178	5.2
	3	192	6.1
8	1	180	7.8
	2	165	4.6
	3	177	8.6

#### 13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации TIMP-1. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения TIMP-1 и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 3.9 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации TIMP-1, нг/мл	Козфф. Вариации (%)
1	235	2.7
2	220	2.7
3	202	4.0
4	101	1.7
5	526	4.5
6	159	6.1
7	189	5.1
8	174	4.5

### 13.3 Извлечение

Восстановление оценивали путем пулирования 3 уровней человеческого TIMP-1 в образцы сыворотки и плазмы (ЭДТА, гепарин). Количество эндогенного человеческого TIMP-1 в ненасыщенной сыворотке или плазме вычитали из значений пика. Результаты восстановления см. в таблице 5.

Таблица 5

Образец	Насыщение высокое, %	Насыщение среднее, %	Насыщение низкое, %
Сыворотка	108	145	105
Плазма (ЭДТК)	92	125	127
Плазма (гепарин)	125	148	134

### 13.4. Линейность

Образцы сыворотки и плазмы (ЭДТК, гепарин) с различными уровнями TIMP-1 были проанализированы в двукратных разведениях, по 4 повтора каждого.

Показано, что извлечение в среднем составило 103 % для образцов сыворотки, 110% для образцов ЭДТК плазмы и 112% для образцов гепариновой плазмы.

### 13.5 Стабильность образцов

#### 13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты образцов сыворотки (насыщенной и ненасыщенной) хранили при -20 °С и оттаивали 5 раз, и определялись уровни человеческого TIMP-1. Существенного снижения реактивности человеческого TIMP-1 обнаружено не было при замораживании и оттаивании.

#### 13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты образцов хранились при температуре -20°C, 2-8°C, комнатной температуре и при 37°C в течение 72 часов, после чего определялись уровни TIMP-1. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности TIMP-1.

### 13.6 Специфичность

Анализ обнаруживает как естественный, так и рекомбинантный человеческий TIMP-1.

Вмешательство циркулирующих факторов иммунной системы оценивали путем насыщения этими белками в физиологически значимых концентрациях положительного образца сыворотки человеческого TIMP-1.

Не было обнаружено перекрестной реактивности, в частности не с MMP-1 (2500 нг/мл), MMP-3 (2000 нг/мл) и MMP-9 (100 нг/мл).

### 13.7 Ожидаемые значения

Панели образцов сыворотки и плазмы (ЭДТК, гепарин) от случайно выбранных доноров (мужчин и женщин) были испытаны на TIMP-1 (См. таблицу 6).

Образец	Кол-во образцов	Диапазон (нг/мл)	Среднее (нг/мл)	SD (нг/мл)
Сыворотка	40	11 - 743	172	130
Плазма (ЭДТК)	40	9 - 321	112	64
Плазма (гепарин)	40	134 - 549	245	110

### 14. ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

### 15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

#### 15.1 Промывочный буфер (1 х)

Добавить Концентрат Промывочного буфера 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

#### 15.2 Рабочий буфер (1x)

Добавить Концентрат Рабочего Буфера 20x (5 мл) к 95 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	95.0
1-12	2 x 5.0	2 x 95.0

#### 15.3 Биотин-Конъюгат

Провести 1:100 разбавление концентрированного раствора Биотин-Конъюгата Рабочим буфером (1x):

Кол-во стрипов	Биотин-Конъюгат (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

#### 15.4 Стрептавидин-HRP

Провести 1:100 разбавление раствора Стрептавидин-HRP с Рабочим буфером (1x):

Кол-во стрипов	Стрептавидин-HRP (мл)	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.06	5.94
1-12	0.12	11.88

#### 15.5 Стандарт человеческого TIMP-1

Растворите лиофилизированный Стандарт TIMP-1 в дистиллированной воде. (Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт.)

### 16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ) (См. оригинал инструкции).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)