

# ДІАГНОСТИЧНИЙ НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ MMP-9

## DMP900, SMP900, PDMP900, Human MMP-9 Immunoassay

Каталог. №: **DMP900, SMP900, PDMP900**  
Виробник : **R&D Systems, Inc. (USA)**

Методика від 8/16



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### ВСТУП (див. оригінал інструкції)

Імунологічний аналіз Quantikine® Human MMP-9 - це твердофазний ІФА тривалістю 3.5 години, призначений для вимірювання Матричної Металопротеїнази людини (MMP-9) (активні форми 92 кДа Pro- і 82 кДа, але не форма 65 кДа) у супернатанах клітинної культури, слині, сироватці, плазмі і сечі. Його калібрували за допомогою СНО-клітинного експресованого рекомбінантного Pro-MMP-9 людини, і антитіла зростали проти рекомбінантного фактора. Природні людські MMP-9 показали криві доза-відповідь, які були паралельними стандартним кривим, отриманим з використанням рекомбінантних стандартів набору Quantikine®, що вказує на те, що цей набір може бути використаний для визначення відносної маси MMP-9 людини.

### ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

У цьому аналізі використовується методика кількісного ферментного імунологічного аналізу типу сендвіч. Моноклональне антитіло, специфічне для людського MMP-9, попередньо наносили на мікропланшет. Стандарти і зразки піпетують в лунки, і MMP-9 зв'язується з іммобілізованим антитілом. Після вимивання незв'язаних речовин до лунок додають ферментативне поліклональне антитіло, специфічне для людського MMP-9. Після промивання для видалення незв'язаного реагенту антитіло-фермент до лунок додають розчин субстрату, і колір розвивається пропорційно до кількості MMP-9, пов'язаного в початковому кроці. Розвиток кольору зупиняється і вимірюється інтенсивність кольору.

### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- ТІЛЬКИ ДЛЯ ДОСЛІДНИЦЬКИХ ЦІЛЕЙ. НЕ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ДІАГНОСТИЧНИХ ПРОЦЕДУРАХ.
- Набір не повинен використовуватися після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці набору.
- Не змішуйте та не замінійте реагенти з реагентами з інших партій або джерел походження.
- Якщо зразки виходять за межі динамічного діапазону аналізу, додатково розбавляйте зразки розчинником калібратора і повторюйте аналіз. Якщо зразки клітинної культури вимагають великих розведень, виконайте проміжне розведення з культуральним середовищем і кінцеве розведення розчинником калібратора.
- Будь-які відхилення в розчиннику калібратора, операторі, методі піпетування, техніці промивання, часі інкубації або температурі, а також терміні зберігання набору можуть викликати зміни в зв'язуванні.
- Зміни у заборі, обробці та зберіганні зразків можуть викликати відмінності у значенні зразка.
- Цей аналіз призначений для усунення перешкод іншими факторами, присутніми в біологічних зразках. До тих пір, поки не будуть протестовані всі фактори в імуноаналізі Quantikine®, можливість інтерференції не може бути виключена.

### ТЕХНІЧНІ ЗАУВАЖЕННЯ

- При змішуванні або відновленні білкових розчинів завжди уникайте піноутворення.
- Щоб уникнути перехресного забруднення, змінійте наконечники піпеток між додаваннями кожного рівня стандарту, між додаваннями зразків і між додаваннями реагентів. Також використовуйте окремі резервуари для кожного реагента.
- Для забезпечення точних результатів необхідна правильна адгезія ущільнювачів для пластини під час інкубації.
- При використанні автоматизованого вошера пластини додавання 30-секундного періоду витримки після додавання буфера для промивання та/або обертання пластини на 180 градусів між етапами промивання може поліпшити точність аналізу.
- Розчин субстрату повинен залишатися безбарвним до моменту додавання до пластини. Зберігайте Розчин субстрату захищеним від світла. Розчин субстрату повинен змінюватися від безбарвного до градації синього.
- Стоп-розчин слід додати до пластини в тому ж порядку, що і розчин субстрату. Колір, що розвивається в лунках, перетворюється з синього на жовтий після додавання стоп-розчину. Лунки зеленого кольору вказують на те, що стоп-розчин не змішаний ретельно з розчином субстрату.

### МАТЕРІАЛИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ І УМОВИ ЇХ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігайте закритий набір при температурі 2-8 °C. Не використовуйте після закінчення терміну придатності.

ЧАСТИНА	№ ЧАСТИНИ	КАТ. № DMP900	КАТ. № SMP900	ОПИС	ЗБЕРІГАННЯ ВІДКРИТОГО/ РОЗВЕДЕНОГО МАТЕРІАЛУ
Мікропланшет MMP-9 людини	890613	1 планшет	6 планшетів	96-лунковий полістирольний мікропланшет (12 смужок по 8 лунок), покритий моноклональним антитілом, специфічним для людського MMP-9.	Поверніть невикористані лунки у футляр з фольгою, що містить осушувач. Закрийте по всьому краю застібки-блискавки. Може зберігатися до 1 місяця при температурі 2-8 °C.
Стандарт MMP-9 людини	890615	2 флаконів	12 флаконів	Рекомбінантний людський Pro-MMP-9 в буферизованій білковій основі з консервантами; ліофілізований. Див. Етикетку флакона щодо об'єму розведення.	Після використання видалити основний розчин MMP-9 і розведення. Використовуйте свіжий стандарт для кожного аналізу.
Кон'югат MMP-9 людини	890614	1 флакон	6 флаконів	21 мл/флакон поліклонального антитіла, специфічного для MMP-9 людини, кон'югованого з пероксидазою хрому з консервантами.	Може зберігатися до 1 місяця при температурі 2-8 °C.
Аналітичний розчинник RD1-34	895265	1 флакон	6 флаконів	11 мл/флакон буферизованої білкової основи з консервантами.	

<b>Розчинник калібратора RD5-10</b>	895266	3 флакон	18 флаконів	21 мл/флакон буферизованої білкової основи з консервантами.
<b>Концентрат буфера для промивання</b>	895003	1 флакон	6 флаконів	21 мл/флакон з 25-кратним концентрованим розчином буферизованої поверхнево-активної речовини з консервантом. <i>З часом може жовтіти.</i>
<b>Колірний реагент А</b>	895000	1 флакон	6 флаконів	12 мл/флакон стабілізованого перекису водню.
<b>Колірний реагент В</b>	895001	1 флакон	6 флаконів	12 мл/флакон стабілізованого хромогену (тетраметилбензидин).
<b>Стоп-розчин</b>	895032	1 флакон	6 флаконів	6 мл/флакон 2 N сірчаної кислоти.
<b>Ущільнювачі для пластики</b>	N/A	4 смужки	24 смужки	Адгезивні смужки.

\* За умови, що це протягом терміну придатності набору.

DMP900 містить достатні матеріали для проведення ІФА на одному 96-лунковому планшеті.

SMP900 (SixPak) містить достатню кількість матеріалів для проведення ІФА на шести 96-лункових планшетах.

Цей набір також доступний у PharmPak (R&D Systems®, Кат. № PDMP900). PharmPaks містить достатню кількість матеріалів для проведення ІФА на 50 мікропланшетах. Специфічна кількість пробірок кожного компонента може змінюватися. Зверніться до літератури, яка супроводжує ваше замовлення, для отримання спеціальних розрахунків флаконів.

#### ІНШІ НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ

- Зчитувач мікропланшетів, здатний вимірювати поглинання при 450 нм, з корекцією довжини хвилі, встановленої на 540 нм або 570 нм.
- Піпетки та наконечники для піпеток.
- Деіонізована або дистильована вода.
- Флакон з розбризуванням, багатоканальний дозатор або автоматизований вошер для мікропланшетів.
- Горизонтальний орбітальний шейкер мікропланшетів (орбіта 0.12"), здатний підтримувати швидкість  $500 \pm 50$  об/хв.
- Пристрій для збору зразків слини, який не має зв'язування з ферментами або можливостей фільтрації, таких як Salivette® або еквівалент.
- Градуирований циліндр на 500 мл.
- Поліпропіленові пробірки для розведення стандартів і зразків.
- Контролі MMP-9 людини (необов'язково; R&D Systems®, Кат. № QC130).

#### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

MMP-9 виявляється в слині. Вживайте запобіжних заходів для запобігання забрудненню реагентів набору під час проведення цього аналізу.

Деякі компоненти цього набору містять консервант, який може викликати алергічну реакцію шкіри.

Уникайте вдихання парів.

Колірний реагент В може викликати подразнення шкіри, очей і дихальних шляхів. Уникайте вдихання.

Одягайте захисні рукавички, одяг, захист очей та обличчя. Ретельно вимити руки після обробки. Зверніться до MSDS на нашому сайті перед використанням.

#### ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ

**Збір зразків та умови зберігання, перелічені нижче, призначені як загальні рекомендації. Стабільність зразків не оцінювалася.**

**Супернатанти культури клітин** - негайно видаліть частинки центрифугуванням і аналізуйте або аліквотуйте і зберігайте зразки при  $\leq -20$  °C. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

**Сироватка** - Використовуйте сепараторну трубку для сироватки (SST) і дозвольте зразкам згортатися протягом 30 хвилин при кімнатній температурі перед центрифугуванням протягом 15 хвилин при 1000 x g. Видаліть сироватку і аналізуйте негайно або аліквотуйте і зберігайте зразки при  $\leq -20$  °C. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

**Збіднена тромбоцитами плазма** - Зберіть плазму на льоду, використовуючи гепарин як антикоагулянт. Центрифугуйте протягом 15 хвилин при 1000 x g протягом 30 хвилин після збору. Для повного видалення тромбоцитів рекомендується додатковий етап центрифугування плазми при 10000 x g протягом 10 хвилин при 2-8 °C. Аналізуйте негайно або аліквотуйте і зберігайте зразки при  $\leq -20$  °C. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

**Примітка:** EDTA і цитрат не є рекомендованими антикоагулянтами для використання в цьому аналізі завдяки їх хелатуючим властивостям.

**MMP-9 вивільняється при активації тромбоцитів. Для вимірювання рівнів циркуляції MMP-9 слід використовувати плазму, вільну від тромбоцитів. Слід зазначити, що багато протоколів для підготовки плазми, включаючи процедури, рекомендовані Інститутом клінічної лабораторії і стандартів (CLSI), призводить до неповного видалення тромбоцитів або активації тромбоцитів. Це може викликати змінні і невідтворювані результати для аналізів факторів, що містяться в тромбоцитах і вивільняються активацією тромбоцитів.**

**Слина** - Зберіть слину за допомогою пристрою для збору, такого як Salivette або еквівалент. Аналізуйте негайно або аліквотуйте і зберігайте зразки при  $\leq -20$  °C. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

**Примітка:** Колектор слини не може мати будь-яких можливостей зв'язування або фільтрації ферментів.

**Сеча** - Асептично зберіть першу сечу дня (середній потік) безпосередньо в стерильний контейнер. Центрифугуйте для видалення твердих частинок. Аналізуйте негайно або аліквотуйте і зберігайте при  $\leq -20$  °C. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

#### ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

**Використовуйте поліпропіленові пробірки.**

Зразки сироватки, клітинної культури і слини вимагають, принаймні, 100-кратного розведення в Розчиннику калібратора RD5-10. Запропоноване 100-кратне розведення становить 10 мкл зразка + 990 мкл Розчинника калібратора RD5-10.

Зразки плазми, бідні на тромбоцити, вимагають, принаймні, 40-кратне розведення в Розчиннику калібратора RD5-10. Запропоноване 40-кратне розведення становить 10 мкл зразка + 390 мкл Розчинника калібратора RD5-10.

## ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Перед застосуванням приведіть всі реагенти до кімнатної температури.

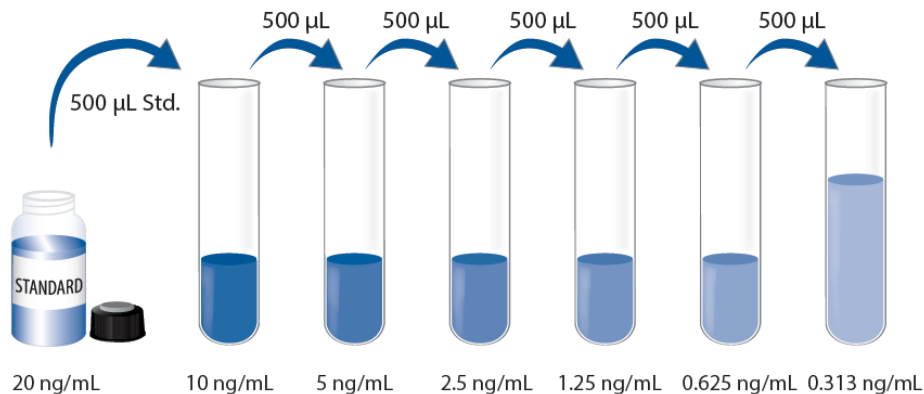
**Примітка:** Високі концентрації MMP-9 знаходяться в слині. Використовуйте маску для обличчя та рукавички для захисту від забруднення реагентів набору.

**Буфер для промивання** - Якщо в концентраті утворилися кристали, нагрійте до кімнатної температури і обережно перемішайте, поки кристали повністю не розчиняться. Додайте 20 мл концентрату Промивного Буфера до деіонізованої або дистильованої води, щоб приготувати 500 мл Буфера для промивання.

**Розчин субстрату** - Колірні реагенти А і В слід змішувати у рівних обсягах протягом 15 хвилин перед використанням. Захищайте від світла. 200 мкл отриманої суміші потрібно на лунку.

**Стандарт MMP-9 людини** - Див. Етикетку флакона для об'єму розведення. Розбавте Стандарт MMP-9 людини деіонізованою або дистильованою водою. Це відновлення дає вихідний розчин 20 нг/мл. Дайте стандарту постояти протягом мінімум 15 хвилин з легким перемішуванням перед тим, як робити розведення.

**Використовуйте поліпропіленові пробірки.** Внесіть в кожну пробірку 500 мкл Розчинника калібратора RD5-10. Використовуйте вихідний розчин для отримання серії розбавлення (нижче). Змішайте кожну пробірку ретельно перед наступною передачею. Високим стандартом служить нерозведений стандарт MMP-9 людини (20 нг/мл). Розчинника калібратора RD5-10 служить нульовим стандартом (0 нг/мл).



## ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед використанням всі реагенти та зразки привести до кімнатної температури. Рекомендується, щоб усі стандарти, зразки та контролю були проаналізовані у двох примірниках.

**Примітка:** Високі концентрації MMP-9 знаходяться в слині. Використовуйте маску для обличчя та рукавички, щоб захистити аналіз від забруднення.

1. Підготувати всі реагенти, робочі стандарти та зразки відповідно до попередніх розділів.
2. Видаліть надлишкові смужки мікропланшетів з рамки пластини, поверніть їх у пакет з фольгою, що містить осушувач, і запечатайте.
3. Додайте до кожної лунки по 100 мкл Розчинника для аналізу RD1-34.
4. Додайте 100 мкл стандарту, контролю або зразка\* на лунку. Накрийте клейкою смужкою. Інкубуйте протягом 2 годин при кімнатній температурі на горизонтальному орбітальному мікропланшеті (0.12" оберти), встановленому на рівні  $500 \pm 50$  об/хв.
5. Аспіруйте кожну лунку і промийте, повторюючи процес тричі з загальною кількістю з чотирьох промивань. Промийте, заповнивши кожну лунку Буфером для промивання (400 мкл), використовуючи пляшку з розбризкуванням, багатоканальний дозатор або автовошер. Повне видалення рідини на кожному кроці має важливе значення для хорошої роботи. Після останнього промивання видаліть залишки Буфера для промивання шляхом відсмоктування або декантації. Переверніть планшет і протріть його чистими паперовими рушниками.
6. Додайте 200 мкл Кон'югату MMP-9 людини до кожної лунки. Накрийте новою клейкою смужкою. Інкубуйте протягом 1 години при кімнатній температурі на шейкері.
7. Повторіть аспірацію/промивку, як у кроці 5.
8. Додайте 200 мкл Розчину субстрату в кожну лунку. Інкубуйте протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на столі. **Захищайте від світла.**
9. Додайте 50 мкл Стоп-розчину в кожну лунку. Колір в лунках повинен змінюватися від синього до жовтого. Якщо колір лунок зелений або зміна кольору не виглядає рівномірною, обережно постукайте по пластині, щоб забезпечити ретельне перемішування.
10. Визначіть оптичну щільність кожної лунки протягом 30 хвилин, використовуючи мікропланшетний рідер, встановлений на 450 нм. Якщо доступна корекція довжини хвилі, встановіть значення 540 нм або 570 нм. Якщо корекція довжини хвилі недоступна, відняти показання при 540 нм або 570 нм від показань при 450 нм. Це віднімання буде коригувати оптичні недоліки в пластині. Показання, зроблені безпосередньо при 450 нм без корекції, можуть бути більш високими і менш точними.

\*Зразки можуть вимагати розведення. Див. Розділ Підготовка зразка.

## РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

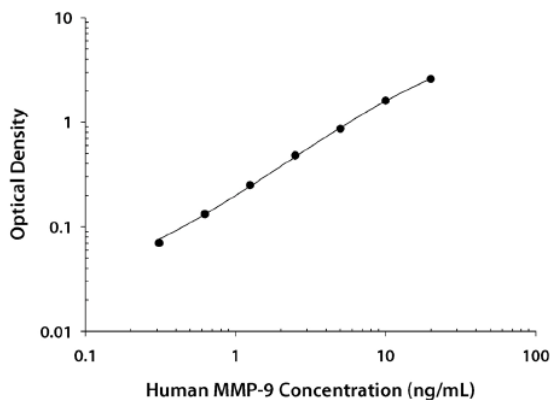
Усередніть повторювані показання для кожного стандарту, контролю і зразка і відніміть середню нульову стандартну оптичну щільність (O.D.).

Створюють стандартну криву, зменшуючи дані за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення, здатного генерувати логістичну (4-PL) криву з чотирма параметрами. В якості альтернативи, побудуйте стандартну криву шляхом побудови графіка середньої абсорбції для кожного стандарту на осі у проти концентрації на осі x і накресліть кращу криву через точки на графіку. Дані можуть бути лінеаризовані шляхом побудови діаграми логарифмічних концентрацій MMP-9 людини порівняно з логарифмом O.D. і краща лінія відповідності може бути визначена регресійним аналізом. Ця процедура дасть адекватну, але менш точну відповідність даних.

Якщо зразки були розведені, концентрація, що читається зі стандартної кривої, повинна бути помножена на коефіцієнт розведення.

## ТИПОВІ ДАНІ

Ця стандартна крива представлена лише для демонстрації. Стандартну криву слід генерувати для кожного набору досліджуваних зразків.



(ng/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.040 0.041	0.040	—
0.313	0.111 0.110	0.110	0.070
0.625	0.172 0.171	0.172	0.132
1.25	0.292 0.288	0.290	0.250
2.5	0.532 0.508	0.520	0.480
5	0.910 0.899	0.904	0.864
10	1.612 1.668	1.640	1.600
20	2.607 2.638	2.622	2.582

## ТОЧНІСТЬ

### Точність внутрішнього аналізу (точність в аналізі)

Три зразки відомої концентрації тестували двадцять разів на одній пластині для оцінки точності внутрішнього аналізу.

### Точність між зразками (точність між аналізами)

Три зразки відомої концентрації були випробувані в сорока окремих аналізах для оцінки точності аналізу. Аналізи виконували принаймні три техніки з використанням двох партій компонентів.

Зразок	Точність в аналізі			Точність між аналізами		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Середнє (нг/мл)	0.833	2.04	11.0	0.972	2.35	12.2
Стандартне відхилення	0.017	0.039	0.316	0.077	0.184	0.845
CV (%)	2.0	1.9	2.9	7.9	7.8	6.9

## ВІДНОВЛЕННЯ

Оцінювали відновлення MMP-9 людини, насичене до трьох рівнів протягом всього діапазону аналізу.

Тип зразка	Середній % відновлення	Діапазон (нг/мл)
Середовище клітинної культури* (n = 5)	97	85-104%
Сироватка* (n = 5)	95	91-99%
Гепаринова плазма, знебіднена на тромбоцити* (n = 5)	96	89-108%
Слина* (n = 4)	90	74-114%
Сеча (n = 5)	91	82-99%

\*Зразки розбавляли перед аналізом, як зазначено в розділі Підготовка зразка.

## ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальна доза, яка виявляється (MDD) MMP-9 людини зазвичай менше 0.156 нг/мл.

MDD визначали шляхом додавання двох стандартних відхилень до середнього O.D. значення двадцяти нульових стандартних повторів і обчислення відповідної концентрації.

## ЛІНІЙНІСТЬ

Щоб оцінити лінійність аналізу, зразки, насичені з або містять високі концентрації MMP-9 людини, розбавляли Розчинником калібратора для отримання зразків зі значеннями в межах динамічного діапазону аналізу.

		Середовище клітинної культури* (n = 5)	Сироватка* (n = 5)	Гепаринова плазма, збіднена на тромбоцити* (n = 5)	Слина* (n = 4)	Сеча (n = 5)
1:2	Середній % очікуваного	104	103	102	105	101
	Діапазон (%)	101-107	99-107	98-107	103-106	96-109
1:4	Середній % очікуваного	104	103	102	108	103
	Діапазон (%)	101-106	99-108	99-106	103-109	95-110
1:8	Середній % очікуваного	102	102	104	111	104
	Діапазон (%)	97-110	96-108	101-110	108-114	94-112
1:16	Середній % очікуваного	102	102	103	110	97
	Діапазон (%)	96-110	95-108	95-110	109-112	90-109

\*Зразки розбавляли перед аналізом, як зазначено в розділі Підготовка зразка.

## КАЛІБРУВАННЯ

Цей імунологічний аналіз калібрують проти високоочищеного рекомбінантного людського Pro-MMP-9 з експресією клітин CHO, виробленого в R&D Systems®.

## ЗНАЧЕННЯ ЗРАЗКІВ

**Сироватка/Плазма, знебіднена на тромбоцити/Слина/Сеча** - Зразки від явно здорових добровольців оцінювали на присутність людського MMP-9 в цьому аналізі. Для донорів, які використовувалися в цьому дослідженні, не було доступних медичних історій.

Тип зразка	Середнє значення виявлення (нг/мл)	% Виявлення	Діапазон (нг/мл)
Сироватка (n = 37)	436	100	169-705
Гепаринова плазма, знебіднена на тромбоцити (n = 37)	32	100	13.2-105
Слина (n = 4)	201	100	102-543
Сеча (n = 53)	3.65	45	ND-33.6

ND = Не виявляється

Супернатанти клітинної культури - мононуклеарні клітини периферичної крові людини ( $5 \times 10^6$  клітин/мл) культивували в RPMI, доповненому 5% фетальної бичачої сироватки, 50 мкМ  $\beta$ -меркаптоетанолю, 2 мМ L-глутаміну, 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Клітини були культивовані нестимульованими або стимульованими з 10 мкг/мл РНА. Аліквоти супернатантів культури клітин видаляли на 1 і 5 дні і аналізували на рівні людського MMP-9.

Стан	День 1 (нг/мл)	День 5 (нг/мл)
Нестимульовані	132	33.8
Стимульовані	522	210

### СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Цей аналіз вимірює природний і рекомбінантний 92 кДа Pro-MMP-9 і 82 кДа активний MMP-9. Він не вимірює форму 65 кДа.

Перераховані нижче фактори були приготовані при 100 або 200 нг/мл в Розчиннику калібратора і аналізувалися на перехресну реактивність. Препарати наступних факторів, приготованих при 200 нг/мл у рекомбінантному MMP-9 людини середнього діапазону, аналізували на інтерференцію. Не спостерігалось значної перехресної реактивності або інтерференції.

#### Рекомбінантна, людини:

ADAM8	MMP-8
ADAM10	MMP-10
ADAM15	MMP-12 (каталітичний домен)
Ліпокальцин-2/NGAL	MMP-13
MMP-1	TACE (ADAM17)
MMP-2	TIMP-2
MMP-3	TIMP-3
MMP-7	TIMP-4

#### Рекомбінантна, миші:

ADAM9
ADAM10
ADAM15
Ліпокальцин-2/NGAL
MMP-2
MMP-3
MMP-9
TIMP-1

З рекомбінантним людським TIMP-1 не спостерігалось перехресної реактивності, але при концентраціях  $\geq 6.25$  нг/мл спостерігалась інтерференція.

Концентрація rhTIMP-1 (нг/мл)	Спостережувана величина (нг/мл)
200	1.241
100	2.026
50	2.920
25	3.651
12.5	4.655
6.25	5.219
0	5.633

Інтерференцію також спостерігали з рекомбінантним щурячим TIMP-1 при концентраціях  $\geq 200$  нг/мл.



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 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)

