

# НАБІР ІФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ MMP-1 ЛЮДИНИ

## ELH-MMP1, Human MMP-1 ELISA

Каталог. №: **ELH-MMP1**

Методика від **12-03-2014**

Кількість : **96**

Виробник : **RayBiotech, Inc. (США)**



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

### I. ВСТУП

(Див. оригінал інструкції).

Набір RayBio® Human MMP-1 ELISA є імуноферментним аналізом для кількісного визначення людського MMP-1 про і активної форм в сироватці, плазмі (з використанням гепарину в якості антикоагулянту; ЕДТА і цитрат не рекомендуються), і супернатанті культури клітин. Цей аналіз використовує антитіло, специфічне для людського MMP-1, нанесеного в 96 лунках планшета. Стандарти і зразки піпетуються в лунки, і MMP-1, присутній у зразку, зв'язується з лунками іммобілізованим антитілом. Лунки промивають і додаються біотинильовані антитіла антилюдського MMP-1. Після вимивання незв'язаного біотинильованого антитіла в лунки піпетується HRP-кон'югований стрептавідин. Лунки знову промивають, в лунки додається розчин субстрату ТМВ і відбувається фарбування в пропорції до кількості зв'язаних MMP-1. Стоп-розчин змінює колір з синього на жовтий, і інтенсивність кольору вимірюється при 450 нм.

### II. РЕАГЕНТИ

1. Мікропланшет MMP-1 (елемент А): 96 лунок (12 стрипів x 8 лунок), покритих анти-людським MMP-1.
2. Концентрат промивного буфера (20X) (елемент В): 25 мл 20X концентрованого розчину.
3. Стандарт білка (елемент С): 2 флакона людського MMP-1. 1 флакона достатньо, щоб запустити кожен стандарт в дублях.
4. Антитіла виявлення MMP-1 (елемент F): 2 флакона біотинильованого анти-людського MMP-1 (кожен флакон є достатнім для аналізу половини мікропланшета).
5. Концентрат HRP-стрептавідин (елемент G): 200 мкл 440X концентрату HRP-кон'югованого стрептавідину.
6. Реагент ТМВ однокрокового субстрату (елемент H): 12 мл 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) в буферному розчині.
7. Стоп-розчин (елемент I): 8 мл 0.2 М сірчаної кислоти.
8. Розчинник для аналізів (елемент E2): 15 мл концентрованого буфера 5X.

### III. ЗБЕРІГАННЯ

Може зберігатися до 6 місяців при 2-8 °C від дати відвантаження. Відкриті мікропланшетні лунки або реагенти можуть зберігатися протягом 1 місяця при 2-8 °C. Повернути невикористані лунки в пакет з осушувачем, запечатати уздовж усього краю. Відновлений стандарт може зберігатися при -80 °C до 1 тижня.

**Примітка:** набір може бути використаний протягом одного року, якщо він зберігався при -20 °C. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

### IV. НЕОБХІДНІ ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ

1. Мікропланшетний рідер, здатний вимірювати оптичну щільність при 450 нм.
2. Точні піпетки об'ємом від 2 мкл до 1 мл.
3. Регульовані піпетки об'ємом 1-25 мл для приготування реагентів.
4. 100 мл і 1 л градуйовані циліндри.
5. Фільтрувальний папір.
6. Дистильована або деіонізована вода.
7. Логарифмічний міліметровий папір або програмне забезпечення для аналізу даних ELISA.
8. Пробірки для підготовки розведення стандарту або зразка.

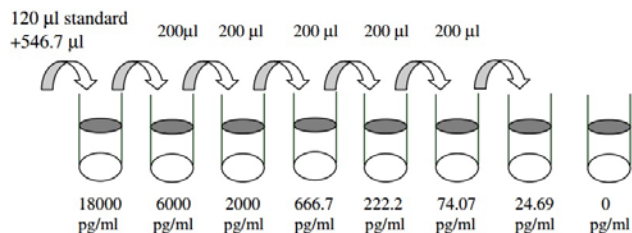
### V. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Доведіть всі реагенти і зразки до кімнатної температури (18-25 °C) перед використанням.
2. Розчинник для зразків (елемент E2) слід розбавити в 5 раз деіонізованою або дистильованою водою перед використанням.
3. Розведення зразків: Розчинник для аналізів 1X (елемент E2) повинен бути використаний для розведення зразків сироватки і

плазми та супернатанта культури клітин. Рекомендоване розбавлення для нормальної сироватки/плазми – в 2 рази. Зібрати плазму використовуючи гепарин в якості антикоагулянту. ЕДТА та цитрат не рекомендуються.

**Примітка:** Рівні MMP-1 можуть змінюватися між різними зразками. Оптимальні коефіцієнти розбавлення для кожного зразка має визначити оператор.

4. Приготування стандарту: Злегка потрясти флакон з елементом С. Додати 400 мкл 1X Розчинника для аналізів у флакон з елементом С для приготування 0.1 мкг/мл стандартного розчину. Повністю розчинити порошок ретельним обережним перемішуванням. Додати 120 мкл стандарту MMP-1 з флакона елемента С в пробірку з 546.7 мкл 1X Розчинника для аналізу для приготування 18000 пг/мл стандартного розчину. Внесіть 400 мкл 1X Розчинника для аналізів в кожну пробірку. Використовуйте стандартний розчин для отримання серії розбавлень (див. Нижче). Ретельно перемішувати кожну пробірку перед наступною передачею. 1X Розчинник для аналізів служить в якості нульового стандарту (0 пг/мл).



5. Якщо Промивний Концентрат (20x) (елемент В) містить видимі кристали, нагріти його до кімнатної температури і обережно перемішати до повного розчинення. Розвести 20 мл Концентрату Промивного Розчину деіонізованою або дистильованою водою до отримання 400 мл 1X Промивного Буфера.
6. Швидко покрутити флакон з Антитілами Виявлення (елемент F) перед використанням. Додати 100 мкл 1X Розчинника для аналізів (елемент E2) в пробірку для приготування концентрату антитіл виявлення. Піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати (Концентрат можна зберігати при температурі 4 °C протягом 5 днів). Концентрат антитіл виявлення повинен бути розведений в 80 разів з 1X Розчинником для аналізу і використаний в кроці 4 частини VI "Процедура аналізу".
7. Швидко покрутити флакон з концентратом HRP-стрептавідину (елемент G) і піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати перед використанням. Концентрат HRP-стрептавідину повинен бути розведений в 440 разів з 1X Розчинником для аналізу (елемент E2).

Наприклад: Швидко покрутити флакон (елемент G) і піпетувати вгору і вниз, щоб акуратно перемішати. Додати 25 мкл Концентрату HRP-стрептавідину в пробірку з 11 мл 1X Розчинника для аналізу для приготування остаточного 440-кратного розведення розчину HRP-стрептавідину (не зберігати розведений розчин для використання на наступний день). Добре перемішати.

### VI. ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

1. Привести всі реагенти і зразки до кімнатної температури (18-25 °C) перед використанням. Рекомендується, щоб всі стандарти і зразки були проаналізовані, щонайменше, в дублях.
2. Додати 100 мкл кожного стандарту (див. Підготовка реагентів крок 3) і зразка у відповідні лунки. Накрити лунку і інкубувати протягом 2,5 годин при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °C при обережному струшуванні.
3. Видалити розчин і промити 4 рази з 1X розчином для промивання. Вимийте кожну лунку за допомогою наповнення Промивним Буфером (300 мкл) з використанням багатоканальної піпетки або авто промивного пристрою. Повне видалення рідини на кожній стадії є необхідною умовою хорошої роботи. Після останньої промивки, видалити залишки промивного буфера шляхом аспірації або декантації. Перевернути планшет і промокнути чистими паперовими рушниками.
4. Додати 100 мкл 1X підготовлених біотинильованих антитіл (Підготовка реагентів крок 6) у кожну лунку. Інкубувати протягом 1 години при кімнатній температурі з обережним струшуванням.
5. Видалити розчин. Повторити промивку як в кроці 3.
6. Додати 100 мкл приготованого Розчину Стрептавідину (див. Підготовка реагентів крок 7) у кожну лунку. Інкубувати протягом 45 хвилин при кімнатній температурі з обережним струшуванням.
7. Видалити розчин. Повторити промивку як в кроці 3.

- Додати 100 мкл реагенту однокрокового Субстрату TMB (елемент Н) в кожну лунку. Витримати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі в темряві з легким струшуванням.
- Додати 50 мкл стоп-розчину (елемент І) у кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

## VII. СУМАРНА ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ

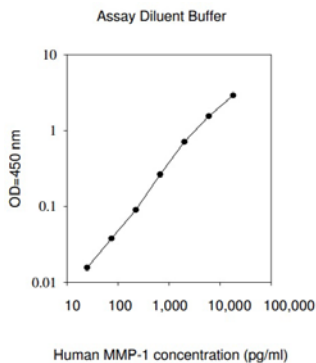
- Підготувати всі реагенти, зразки і стандарти відповідно до інструкцій.
- Додати 100 мкл стандарту або зразка в кожну лунку. Витримати 2,5 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С.
- Додати 100 мкл підготовлених антитіл біотину в кожну лунку. Інкубувати 1 годину при кімнатній температурі.
- Додати 100 мкл приготованого розчину стрептавідину. Інкубувати 45 хвилин при кімнатній температурі.
- Додати 100 мкл однокрокового Реагенту субстрату TMB в кожну лунку. Інкубувати 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Додати 50 мкл стоп розчину в кожну лунку. Зчитати результат при 450 нм негайно.

## VIII. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахувати середню абсорбцію для кожного набору повторюваних стандартів, зразків і, і відняти середню оптичну щільність нульового стандарту. Побудувати Стандартну криву на логарифмічному міліметровому папері або за допомогою програмного забезпечення Sigma, зі стандартною концентрацією на осі x і абсорбцією на осі y. Намалювати найбільш підходящу пряму лінію через стандартні точки.

## A. ТИПОВІ ДАНІ

Ці стандартні криві призначені тільки для демонстрації. Стандартна крива повинна бути побудована для кожного аналізу.



## B. ЧУТЛИВІСТЬ

Мінімальна доза виявлення людського MMP-1 становить 8 пг/мл. Мінімальна доза виявлення визначається як концентрація аналіту, яка є результатом поглинання, яке на 2 стандартних відхилення вище, ніж бланк (буфер розчинника).

## C. НАСИЧЕННЯ І ВІДНОВЛЕННЯ

Відновлення визначалося додаванням різних рівнів MMP-1 в нормальні людські сироватки, плазми і супернатанти культури клітин. Середні відновлення наведені нижче:

Тип зразка	Середнє відновлення, %	Діапазон, %
Сироватка	97.78	88-106
Плазма	99.59	90-107
Середовище культури клітин	98.66	90-106

## D. ЛІНІЙНІСТЬ

Тип зразка	Сироватка	Плазма	Середовище культури клітин
1:2	98	99	98
Діапазон (%)	90-106	89-106	89-107
1:4	97	95	96
Діапазон (%)	90-106	89-107	90-107

## E. ВІДТВОРЮВАНІСТЬ

В постановці: CV < 10%  
Між постановками: CV < 12%

## IX. СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Даний ІФА не проявляє перехресної реактивності з будь-яким з наступних випробуваних цитокінів: *human Angiogenin, BDNF, BLC, ENA-78, FGF-4, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 p70, IL-12 p40, IL-13, MMP-1, IL-309, IP-10, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, Leptin (OB), MCP-1, MCP-3, MDC, MIP-1α, MIP-1 β, MIP-1, MMP-1, -2, -3, -10, PARC, RANTES, SCF, TARC, TGF-β, TIMP-1, TIMP-2, TNF-α, TNF-β, TPO, VEGF.*

## X. МОЖЛИВІ НЕСПРАВНОСТІ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

Проблема	Причина	Усунення
Погана стандартна крива	<ul style="list-style-type: none"> <li>Неакуратне піпетування</li> <li>Неадекватне розведення стандарту</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити піпетки</li> <li>Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням</li> </ul>
Слабкий сигнал	<ul style="list-style-type: none"> <li>Занадто короткий час інкубації</li> <li>Неадекватні обсяги реагентів або неправильне розведення</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Переконайтеся, що Ви покрутили пробірку з елементом С і ретельно розчинили порошок обережним перемішуванням</li> <li>Переконайтеся в достатньому часі інкубації; крок 2 процедури аналізу поміняти на інкубацію протягом ночі</li> <li>Перевірте піпетки і переконайтеся в належній підготовці</li> </ul>
Високий CV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Неакуратне піпетування</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірте піпетки</li> </ul>
Завищений задній фон	<ul style="list-style-type: none"> <li>Планшет погано промитий</li> <li>Забруднений промивний буфер</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Перевірити інструкції щодо належного промивання</li> <li>Якщо використовується промивний пристрій, перевірте, чи всі порти доступні</li> <li>Приготуйте свіжий промивний буфер</li> </ul>
Низька чутливість	<ul style="list-style-type: none"> <li>Неналежне зберігання набору</li> <li>Стоп розчин</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Зберігати стандарт при &lt; -70 °С після відновлення, решту при 4 °С. Зберігати розчин субстрату захищеним від світла</li> <li>Стоп розчин повинен бути доданий в кожну лунку перед аналізом</li> </ul>



## ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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)