

потім аспіруйте рідину з лунок. Повторіть стільки разів, скільки вказано в розділі **ПРОЦЕДУРА МЕТОДУ**. Після закінчення промивання переверніть мікропланшет і підсушіть його на чистому фільтрувальному папері.

Альтернативно, готовий **Буфер для Промивок** може бути налитий в пляшку з пульверизатором. При використанні пляшки з пульверизатором повністю заповніть лунки мікропланшетів готовим буфером для промивок. Після закінчення промивання переверніть мікропланшет і підсушіть його на чистій фільтрувальній папері.

При використанні автоматичного вошера дотримуйтесь інструкції виробника приладу.

ПРИГОТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ

A. Відновлення і Розведення Стандарту Ну MMP-3

Примітка: Як скляні так і пластикові пробірки можуть бути використані для стандартних розведень.

1. Розвести стандарт до 200 нг/мл з **Буфером Розчинника Стандарту**. Інструкції на етикетці стандарту. Акуратно перемішати і залишити на 10 хвилин, щоб забезпечити повне відновлення. Використати стандарт протягом 1 години після відновлення.
2. Додати 0.05 мл відновленого стандарту в пробірку, що містить 0.450 мл **Буфера Розчинника Стандарту**. Позначити як 20 нг/мл Ну MMP-3. Перемішати.
3. Додати 0.200 мл **Буфера Розчинника Стандарту** в кожну з 5 пробірок мічених 10, 5, 2.5, 1.25 і 0.62 нг/мл Ну MMP-3.
4. Провести серійні розведення стандарту, як описано в наступній таблиці розведення. Ретельно перемішати між кроками.

B. Розведення Стандарту Ну MMP-3

Стандарт:	Додати:	До:
20 нг/мл	Підготувати як описано в Кроці 2.	
10 нг/мл	0.200 мл Стандарту 20 нг/мл	0.200 мл Буфера Розчинника
5 нг/мл	0.200 мл Стандарту 10 нг/мл	0.200 мл Буфера Розчинника
2.5 нг/мл	0.200 мл Стандарту 5 нг/мл	0.200 мл Буфера Розчинника
1.25 нг/мл	0.200 мл Стандарту 2.5 нг/мл	0.200 мл Буфера Розчинника
0.62 нг/мл	0.200 мл Стандарту 1.25 нг/мл	0.200 мл Буфера Розчинника
0 нг/мл	0.200 мл Буфера Розчинника	Порожньої пробірки

Не зберігати всі відновлені та розбавлені стандарти, які залишились, після завершення аналізу. Повернути **Буфер Розчинника Стандарту** в холодильник.

C. Зберігання та Кінцеве Розведення Стрептавідину-HRP

1. Розвести 10 мкл розчину Концентрату 100X з 1 мл **Розчинника Стрептавідин-HRP** для кожної 8-лункової смужки, яка використовується в аналізі. Позначити як Робочий Розчин Стрептавідин-HRP.

Наприклад:

Кількість 8-лункових смужок	Об'єм Концентрату Стрептавідин-HRP, мкл	Об'єм Розчинника, мл
2	20 мкл розчину	2
4	40 мкл розчину	4
6	60 мкл розчину	6
8	80 мкл розчину	8
10	100 мкл розчину	10
12	120 мкл розчину	12

2. Повернути концентрат **Стрептавідин-HRP**, який не використовується, в холодильник.

D. Розведення Буфера для промивок

1. Перед використанням **Концентрат Буфера для Промивок (25X)** повинен досягти кімнатної температури. Перемішайте концентрат перед розведенням, переконайтеся, що кристали солі, які випали в осад, повністю розчинилися. Розведіть 1 частину **25X Концентрату Буфера для Промивок** в 24 частинах дистильованої води (наприклад, 50 мл концентрату можна розвести до 1.25 л дистильованою водою, 100 мл концентрату можна розвести до 2.5 л дистильованою водою). Надпишіть флакон з приготованим розчином як «Готовий Буфер для Промивок».
2. Зберігайте і концентрат буфера для промивок і готовий буфер для промивок в холодильнику. Готовий буфер для промивок повинен бути використаний протягом 14 днів.

ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Перед виконанням аналізу уважно ознайомтеся з розділом Зауваження по Процедурі/Лабораторний Контроль Якості.

Всі реагенти та зразки повинні досягти кімнатної температури перед використанням. Всі реагенти необхідно ретельно і обережно перемішувати перед використанням.

Зауваження: Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу.

1. Взяти необхідну для проведення аналізу кількість смужок. Невикористані смужки зберігайте в пакеті з осушувачем при 2-8 °C. Помістіть необхідну кількість смужок в тримач. Поверніть смужки, що залишилися, в пакет і пакет помістіть в холодильник.
2. Розвести зразки сироватки/плазми/синовіальної рідини та зразки культури клітин з **Буфером Розчинника Стандарту**. Ми рекомендуємо, щоб кожна лабораторія встановила свій власний діапазон розведення. Див. розділ **ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ**.
3. Внести по 50 мкл **Інкубаційного Буфера** в лунки мікропланшета. Лунка(и) для хромогенного Бланка повинна залишатися порожньою.
4. Додати 50 мкл **Буфера Розчинника Стандарту** в нульові лунки. Лунка(и) для хромогенного Бланка повинна залишатися порожньою.
5. Додати 50 мкл стандартів або зразків у відповідні лунки мікропланшета. (Див. розділ **ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ**, пункт В).
6. Піпетувати 50 мкл розчину біотинильованого анти-Ну MMP-3 (**Біотинового Кон'югат**) в кожну лунку, за винятком хромогенного бланка. Обережно постукайте по сторонній пластині для змішування.
7. Закрити планшет плівкою та інкубувати **2 години при кімнатній температурі**.
8. Повністю видалити вміст лунок аспірацією або декантуванням. Промийте лунки 4 рази, як це зазначено в розділі **РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРОМИВКИ**.
9. Внести по 100 мкл Робочого Розчину Стрептавідин-HRP в усі лунки, за винятком бланка. (Підготувати робоче розведення, як описано в розділі **ПРИГОТУВАННЯ І ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ**, пункт С).
10. Закрити планшет плівкою та інкубувати **30 хвилин при кімнатній температурі**.
11. Повністю видалити вміст лунок аспірацією або декантуванням. Промийте лунки 4 рази, як це зазначено в розділі **РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРОМИВКИ**.
12. Внести по 100 мкл **Стабілізуючого Хромогену** в усі лунки. Колір розчину має змінитися на блакитний.
13. Інкубувати **30 хвилин при кімнатній температурі в темряві**. **Зауваження:** Не закривайте мікропланшет алюмінієвою фольгою або металізованою магнітною плівкою. Час інкубації з хромогенним субстратом визначається типом використовуюваного мікропланшетного рідера. Багато рідерів здатні зчитувати оптичну щільність тільки до 2.0 Од оптичної щільності. Для подібних фотометрів реакція повинна бути зупинена до досягнення яскравого забарвлення лунками в межах вимірювання інструменту. Визначайте оптичну густину в лунках при 450 нм тільки після внесення **Стоп-Розчину**. Якщо у рідера верхня межа зчитування 2.0 Од оптичної щільності, заповніть реакцію через 20-25 хвилин інкубації.
14. Додати по 100 мкл **Стоп Розчину** в усі лунки. Постукайте обережно по тримачу стрипів для перемішування реагентів. Колір розчину в лунках повинен змінитися з блакитного на жовтий.
15. Визначити оптичну густину в лунках при 450 нм проти «хромогенного бланка», що представляє собою суміш 100 мкл **Хромогенного Розчину** і 100 мкл **Стоп-Розчину**. Визначте оптичну щільність не пізніше ніж через 2 години після внесення **Стоп-Розчину**.
16. Відкласти на міліметровому папері поглинання стандарту проти концентрації стандарту. (Оптимально, фонове поглинання може бути вираховане зі значень усіх точок, у тому числі стандартів, невідомих зразків та контролів, до побудови графіка). Намалюйте оптимальну криву через ці точки, щоб побудувати стандартну криву. При використанні програмного забезпечення 4-параметровий алгоритм забезпечує побудову найкращої кривої.
17. Зчитати концентрації Ну MMP-3 для невідомих зразків і контролів зі стандартної кривої, побудованої в кроці 16. (Зразки зі значеннями більше, ніж найвищий стандарт (20 нг/мл) необхідно розвести в **Буфері Розчинника Стандарту** і аналізувати повторно, помножити на відповідний коефіцієнт розведення).

ТИПОВІ ДАНІ

Наступні дані були отримані для різних стандартів в діапазоні від 0 до 20 нг/мл Hu MMP-3.

Стандарт Hu MMP-3, нг/мл	Оптична щільність (450 нм)
0	0.042
	0.038
0.62	0.081
	0.071
1.25	0.134
	0.142
2.5	0.278
	0.291
5	0.811
	0.840
10	1.693
	1.699
20	3.011
	3.080

ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

Не екстраполюйте результати вище значення максимального стандарту 20 нг/мл; залежність концентрація/оптична щільність нелінійна в цьому діапазоні, і точності вимірювання важко досягти. У цьому випадку всі зразки мають бути розведені буфером для розведення стандарту і проаналізовані ще раз, а результат необхідно помножити на відповідний коефіцієнт розведення. Вплив різних ліків, абераційних (відхиляються від норми) сироваток (гемоліз, гіперліпідемія, жовтяниця і т.д.) і використання інших біологічних зразків не до кінця досліджено. Ступінь деградації нативного Hu MMP-3 в різних матриксах не досліджена. У літературі, присвяченій імуноаналізу, часто містяться посилання на перешкоди сигналу в деяких сироватках, приписувані впливу гетерофільних антитіл. Хоча нами і не були помічені такі зразки, не можна виключати можливість подібного впливу.

Тільки для дослідницьких цілей. УВАГА: Не для терапевтичного або діагностичного використання на людях або тваринах.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛІЗУ

Чутливість

Мінімально обумовлена концентрація Hu MMP-3 склала < 0.1 нг/мл і була розрахована по калібрувальній кривій, як рівень, відповідний сумі 2-х стандартних відхилень і середнього значення ОП, отриманого для стандарту 0 нг/мл в результаті 24 визначень.

Точність

1. Точність в аналізі

Зразки відомої концентрації Hu MMP-3 аналізували в 24 повторях для визначення точності у межах аналізу.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Середнє значення, (нг/мл)	2.45	5.6	11.4
Стандартне відхилення, (нг/мл)	0.12	0.16	0.46
Коефіцієнт варіації, (%)	4.9	2.8	4.0

2. Точність між аналізами

Зразки аналізувалися 40 разів в багатьох аналізах.

	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3
Середнє значення, (нг/мл)	3.9	8.4	16.3
Стандартне відхилення, (нг/мл)	0.22	0.36	1.06
Коефіцієнт варіації, (%)	5.6	4.3	6.5

Лінійність розведення

Зразки людської сироватки, гепаринової плазми, синовіальної рідини і клітинної культури були серійно розведені в *Буфері Розчинника Стандарту* в діапазоні аналізу. Лінійний регресійний аналіз зразків у порівнянні з очікуваною концентрацією дав середній коефіцієнт кореляції 0.99.

Розведення	Гепаринова плазма			Сироватка		
	Отримане нг/мл	Очікуване нг/мл	% Очікуваного	Отримане нг/мл	Очікуване нг/мл	% Очікуваного
Немає	13.4	-	-	5.7	-	-
1/2	7	6.7	104	3.1	2.85	109
1/4	3.6	3.4	106	1.5	1.4	107
1/8	1.8	1.7	106	0.75	0.71	105
1/16	0.95	0.84	113			

Розве-	Синовіальна рідина		
	Отри-	Очіку-	%

дення	мане нг/мл	ване нг/мл	Очікуваного
1/120	17.2	-	-
1/240	8.4	8.6	97
1/480	4.1	4.3	95
1/960	2.3	2.15	106
1/1920	1.2	1.08	111
1/3840	0.52	0.54	96

Клітинна культура			
Розведення	Отримане нг/мл	Очікуване нг/мл	% Очікуваного
1/1	16.8	-	-
1/2	8.8	8.4	104
1/4	4.3	4.2	102
1/8	2.3	2.1	109
1/16	1.04	1.05	99

Відновлення

Відновлення Hu MMP-3, доданого до людської сироватки, гепаринової плазми та синовіальної рідини в середньому становить 105%, 97.6% і 96%, відповідно. Відновлення Hu MMP-3 доданого до Зразків культури клітин, що містить як 1% так і 10% фетальної телячої сироватки, в середньому становить 90%.

Специфічність

Перехресна реактивність була визначена шляхом додавання різних матриць металопротеїнази до 0, 5 або 10 нг/мл pro-MMP-3 і очевидне значення pro -MMP-3 було отримане.

Added pro-MMPs (1000 ng/mL) to Pro-MMP-3 samples	Observed Values for 0 ng/mL Pro-MMP-3	Observed Values for 5 ng/mL Pro-MMP-3	Observed Values for 10 ng/mL Pro-MMP-3
Hu. Pro-MMP-1	0	4.8	10.4
Hu. Pro-MMP-2	0	4.6	10.2
Hu. Pro-MMP-9	0	4.9	10.5

Реактивність вільного активного MMP-3 і активного MMP-3 в комплексі з TIMP1, TIMP2 або альфа-2-макроглобуліном (α2-макро) наведені в таблиці нижче:

MMP-3	Inhibitor			
	None	TIMP1	TIMP2	α2-macro
Pro-MMP-3	100%	100%	100%	100%
Active MMP-3 by trypsin	75-90%	75-90%	75-90%	3%

Хук-Ефект

Зразки, збагачені 10 мкг/мл Hu MMP-3, давали відповідь вище найвищого стандарту.

Очікувані значення

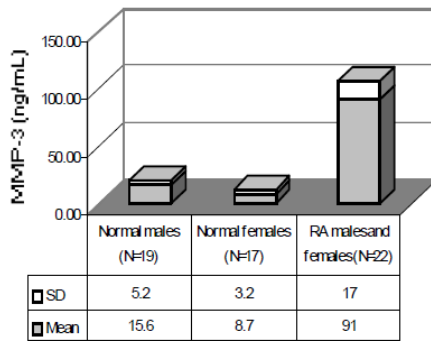
Ми рекомендуємо, щоб кожна лабораторія встановлювала свої власні нормальні значення. Зверніться до наступної інформації.

Сироватка та плазма

Середнє 20 нормальних сироваток становило 10.7 нг/мл (SD = 7.8), в діапазоні від 2 до 28.8 нг/мл. Середнє 20 нормальних зразків гепаринової плазми становить 9.3 нг/мл (SD = 6.3), в діапазоні від 1.6 до 24.2 нг/мл.

Концентрації MMP-3 були значно вище в нормальній сироватці чоловіків, ніж в нормальній жіночій сироватці. У порівнянні з цими групами, концентрації MMP-3 були значно вищими в сироватках при ревматоїдному артриті (RA).

MMP-3 concentrations in sera

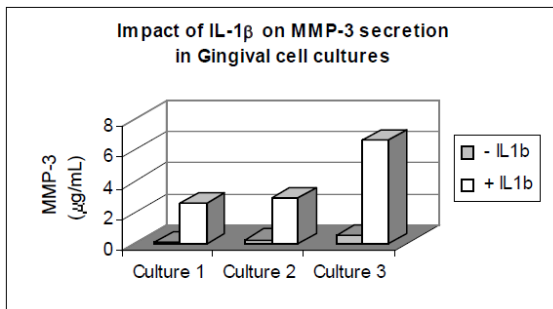


ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

Супернатанти культури клітин

Фібробласти ясен людини культивували в середовищі DMEM, доповненому або ні з IL-1 β (10^{-10} M). Виявлені концентрації MMP-3 були в діапазоні 0.08-6.6 мкг/мл, і виробництво MMP-3 сильно стимулюється IL-1 β .



Синовіальні рідини

Концентрації MMP-3 були виміряні в 146 зразках синовіальної рідини пацієнтів з захворюванням меніска (чоловіки), травмами, хондромалією (СМ), остеоартритом (ОА), хронічною кристалічною хворобою пірофосфату (СРРД), гострою кристалічною хворобою пірофосфату (СРРД гостра), подагрою, реактивним артритом (ReA) і ерозивно ревматоїдним артритом (RA ерозивний). Концентрації MMP-3 знаходяться в діапазоні 0.2-63 мкг/мл. Аналогічні концентрації були виявлені в зразках синовіальної рідини у чоловіків, при травмах, СМ, ОА та СРРД хронічному. У порівнянні з цими групами, концентрації MMP-3 були значно вище при запальній артропатії.

MMP-3 concentrations in synovial fluids

