

BG051PO001-3.3.06 -0059

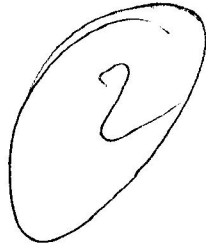
ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ.

Бенефициент:

Институт по биология и имунология на размножаването "Акад. Кирил Братанов"

Партньори:

Софийски Университет „Св. Климент Охридски“, Биологически Факултет
Химикотехнологичен и металургичен университет, катедра „Биотехнология“
Проген ООД



Образец № 3

ДО ИБИР – БАН
бул. „Цариградско шосе“ № 73
гр. София

ТЕХНИЧЕСКА ОФЕРТА

За участие в открита процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет:
«Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции»

ЗА ОБОСОБЕНА ПОЗИЦИЯ № и име .

Обособена позиция № 21 – Колориметрични и хемилуминисцентни тестове, съвместими за работа с флуоресумътър Fluorostar Optima

Настоящата оферта е подадена от: Ай Ви Ди България ООД/наименование на участника/, ЕИК/БУЛСТАТ 200123131;

УВАЖАЕМА ГОСПОЖО ДИРЕКТОР,

Заличени
подписи - чл.2,
ал.1 от ЗЗЛД

1. С настоящето представяме нашата техническа оферта за **Обособена позиция № 21 – Колориметрични и хемилуминисцентни тестове, съвместими за работа с флуоресумътър Fluorostar Optima.** (офертата се изготвя за всяка обособена позиция по отделно) от поръчката.

Предлагаме следните артикули за обособената позиция, по която участвуваме, като прилагаме поделена таблица, доказваща съответствието на предлаганите от нас артикули с изискванията на възложителя:

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК - търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
№ по ред	Номер от ОП	Наименование	Единица мярка	Количество	Предложение на участника, включващо технически характеристики на артикула, съобразно изискванията на техническата спецификация на Възложителя	Предложение на участника, включващо каталожен или партиден номер на артикула, даден от производителя на артикула и име на производителя на артикула (тази колона се попълва задължително само за обособени позиции № 1 - 10)
	ОП Р-21	Обособена позиция № 21 – Колориметрични и хемилуминисцентни тестове, съвместими за работа с флуоремутър Fluorostar Optima				

1	ОП Р-21-1	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-2; Ex/Em=490 nm/520 nm;	кит	1	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-2; Ex/Em=490 nm/520 nm;	AS-72224/96 tests/ANASPEC
2	ОП Р-21-2	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-9; Ex/Em=490 nm/520 nm;	кит	1	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-9; Ex/Em=490 nm/520 nm;	AS-72017/96 tests/ANASPEC
3	ОП Р-21-3	Флуориметричен кит за измерване на ензимната активност на Neprilysin; Ex/Em=490 nm/520 nm;	кит	1	Флуориметричен кит за измерване на ензимната активност на Neprilysin; Ex/Em=490 nm/520 nm;	AS-72223/96 tests/ANASPEC
4	ОП Р-21-4	Флуориметричен кит за измерване на ензимната активност на ACE2; Ex/Em=330 nm/390 nm;	кит	1	Флуориметричен кит за измерване на ензимната активност на ACE2; Ex/Em=330 nm/390 nm;	AS-72086/96 tests/ANASPEC
5	ОП Р-21-5	ELISA кит за количествено определяне на MMP-2 (матриксна металопротеиназа-2)	кит	1	ELISA кит за количествено определяне на MMP-2 (матриксна металопротеиназа-2)	KA0391/96 tests/Abnova
6	ОП Р-21-6	ELISA кит за количествено определяне на MMP-9 (матриксна металопротеиназа-9)	кит	1	ELISA кит за количествено определяне на MMP-9 (матриксна металопротеиназа-9)	BMS2016/2/96 tests/Bioscience

Заличен подпис - чл.2, ал.1 от 33ЛД

Заличен печат - чл.37, ал1 от 33К - търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от 33ЛД

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Заличен подпис - чл.2, ал.1 от 33ЛД

Заличени подписи - чл.2, ал.1 от 33ЛД

					металопротеиназа-9)	
7	ОП Р-21-7	ELISA кит за количествено определяне на CD83	кит	1	ELISA кит за количествено определяне на CD83	MBS924667/96 tests/MyBiosorce
8	ОП Р-21-8	Желатин - FITC, разфасовка от 5 mg	опаковка	5	Желатин - FITC, разфасовка от 5 mg	AS-85145/5mg/ANASPEC
9	ОП Р-21-9	Човешки MMP-2 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	опаковка	1	Човешки MMP-2 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	AS-72005/10 µg/mL/ANASPEC
10	ОП Р-21-10	Човешки MMP-9 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	опаковка	1	Човешки MMP-9 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	AS-55576-10/10µg/mL/ANASPEC

Забележка: Колони (1) – (5) от таблицата се попълват съгласно Техническата Спецификация на Възложителя - Приложение № 1 от документацията за участие – без да се променят !!

2. Срокът за изпълнение на доставки по обособената позиция, след получаване на възлагателно писмо от Възложителя е до **3 (три) календарни дни** (минимум 1 ден и не повече от 45 календарни дни. При непълване от участника се приема 45 кал. дни).

3. За обособени позиции № 1 – 38: Остатъчният срок на годност на предложените с офертата стоки към датата на доставка ще бъде **12 (дванадесет) месеца** (не по-малко от 9 месеца, където е приложимо). Под остатъчен срок на годност се има предвид времето за което реактивът е годен за употреба след доставка в сградата на Възложителя.

4. Ако бъдем избрани за изпълнител се ангажираме да осигурим предложените с офертата стоки за целия срок на договора. В случай, че поради непредвидени обстоятелства същите бъдат спрени от производство се ангажираме да предложим продукт с еквивалентни или сходни характеристики.

5. Осигуряваме следното време за реакция, при подадена рекламация на артикул от страна на Възложителя, съгласно условията на договора: **1 (един) календарен ден** (минимум 1 и максимум 14 календарни дни. При непълване от участника се приема 14 кал. дни). В посочения срок ще отговорим на Възложителя обосновано в писмен вид дали приемаме или отхвърляме рекламацията.

6. Стоките (с изключение на рециклирани тонери) ще се доставят в оригинална, ненарушена опаковка на производителя, при спазване на условията на производителя за транспорт и съхранение на артикула.

7. При доставка, стоките ще бъдат придружени от приложимите за случая сертификати и документи, издадени от производителя и/или контролиращи организации.

8. Подаването на настоящата техническа оферта удостоверява безусловното приемане от наша страна на всички изисквания и задължения, поставени от Възложителя в провежданата процедура за съответната обособена позиция.

! ВАЖНО: Ако участникът подава оферта за повече от една обособена позиция, плик № 2, т.е. Техническа оферта се представя за всяка обособена позиция по отделно в отделен плик № 2 и се надписва по следния начин:

„Име на участника:“

Предложение за изпълнение на поръчката по обособена позиция №“

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличени подписи - чл.2,
ал.1 от ЗЗЛД

Дата 08.08.2014
гр. София

.....
/ подпис, печат/

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Ай Ви Ди България ООД

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“

Заличени подписи - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Ай Ви Ди България
София 1756
ж.к. Дървеница Бл. 48, вх. В

Заличени данни - чл.37, ал. 1 от ЗЗК - търговска тайна

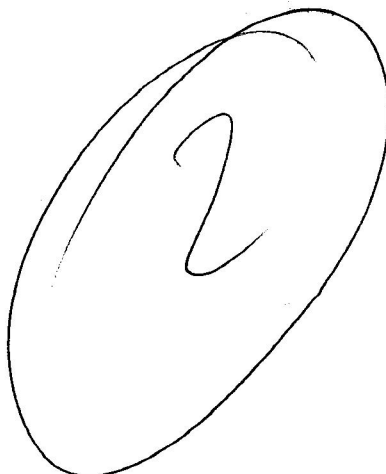
Заличени данни - чл.37, ал. 1 от ЗЗК - търговска тайна

Изх. No: 165/07.09.2014

До

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Председател на комисията
ИБИР БАН - София
Бул. Цариградско шосе 73
гр. София



Относно: Открита процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет:
"Доставка на материали и реактиви и консумативи по обособени позиции" с 39 обособени позиции,
открита с решение N 375-НО от 20.06.2014г. На Възложителя

Уважаеми Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

4.6.1 Приложен електронен носител с методики на английски и български За об. Позиция 21 /всички подпозиции от 21.1 до 21.10/

4.6.2. Описателен лист за За об. Позиция 21 /всички подпозиции от 21.1 до 21.10/

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

Заличени текстове, тъй като се отнасят до други обособени позиции.

Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

С Уважение,

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

/Управител/

07.09.2014 г.

София

**ОПИСАТЕЛЕН ЛИСТ ЗА ПРЕДОСТАВЕНИТЕ МЕТОДИКИ НА ДИСК ПО ОБОСОБЕНА
ПОЗИЦИЯ**

21

НОМЕР ОТ ОП	НАИМЕНОВАНИЕ	Име на файл
ОП P-21-1	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-2; Ex/Em=490 nm/520 nm;	ОП P-21-1
ОП P-21-2	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-9; Ex/Em=490 nm/520 nm;	ОП P-21-2
ОП P-21-3	Флуориметричен кит за измерване ензимната активност на Nephilysin; Ex/Em=490 nm/520 nm;	ОП P-21-3
ОП P-21-4	Флуориметричен кит за измерване ензимната активност на ACE2; Ex/Em=330 nm/390 nm;	ОП P-21-4
ОП P-21-5	ELISA кит за количествено определяне на MMP-2 (матриксна металопроотеиназа-2)	ОП P-21-5
ОП P-21-6	ELISA кит за количествено определяне на MMP-9 (матриксна металопроотеиназа-9)	ОП P-21-6
ОП P-21-7	ELISA кит за количествено определяне на CD83	ОП P-21-7
ОП P-21-8	Желатин - FITC, разфасовка от 5 mg	ОП P-21-8
ОП P-21-9	Човешки MMP-2 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	ОП P-21-9
ОП P-21-10	Човешки MMP-9 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	ОП P-21-10

Приложените методики на ел. носител са представени на англ. и в превод на български език.

05.09.2014

Георги Ралчев – управител
Ай Ви Ди България ООД

Заличен печат - чл.37, ал. 1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД



SensoLyte[®] Plus 520 MMP-2 Assay Kit

Fluorimetric and Enhanced Selectivity

Catalog #	72224
Kit Size	96 Assays in 96-well plate
<ul style="list-style-type: none"> ● Optimized Performance: Optimal conditions for specifically detecting MMP-2 activity. ● Enhanced Value: It provides ample reagents to perform 100 assays in a 96-well format. ● Assured Reliability: Detailed protocol and references are provided. 	

Kit Components, Storage and Handling

Component	Description	Quantity
Component A	Microplate coated with monoclonal anti human MMP-2 antibody	12 x 8 black strips
Component B	MMP-2 standard, recombinant human pro-MMP-2	10 µg/mL, 15µL
Component C	Assay buffer	50 mL
Component D	10X Wash buffer	50 mL
Component E	APMA, 4-aminophenylmercuric acetate <i>Caution: Contain organic mercury. Dispose according to your local regulations.</i>	100 mM, 150 µL
Component F	MMP-2 substrate 5-FAM/QXL [™] 520 FRET peptide Ex/Em=490 nm/520 nm upon cleavage	50 µL
Component G	Stop Solution	10 mL
Component H	Adhesive cover strip	3 sheets

Other Materials Required (but not provided)

- Fluorescence microplate reader: Capable of detecting emission at 520 nm with excitation at 490 nm.

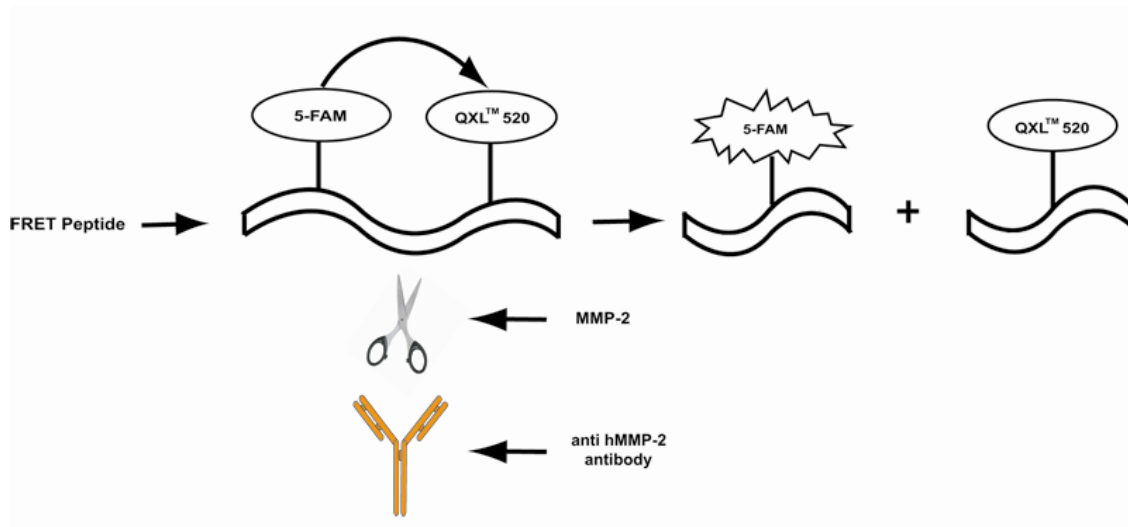
Storage and Handling

- Store all kit components, except Component B, at -20°C.
- Store Component B at -80°C.
- For convenience, Components D, G, and H can be stored at room temperature (RT).

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a family of secreted or membrane-associated zinc endopeptidases capable of digesting extracellular matrix components.^{1, 2} MMP-2 (72-kDa gelatinase-A/type IV collagenase) is responsible for degradation of collagen, fibronectin, laminin, and elastin.^{3, 4} It has been shown that MMP-2 plays a key role in angiogenesis, tumor cell invasion, and metastasis.⁵⁻⁷ MMP-2 is also considered a therapeutic target for cancer.^{8, 9}

The SensoLyte[®] Plus 520 MMP-2 Assay Kit is designed specifically for detecting MMP-2 activity in biological samples, such as culture medium, serum, plasma, synovial fluid, and tissue homogenate, which may contain multiple MMPs. Members of the MMP family have poor substrate sequence specificity, thus using peptide substrate alone to differentiate the activity of a particular MMP from other MMPs is inadequate. A monoclonal anti-human-MMP-2 antibody is therefore employed to pull down MMP-2 from the mixture. MMP-2 activity is then quantified by a 5-FAM/QXL[™] 520 fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide (Scheme 1). The long wavelength fluorescence of 5-FAM is less interfered by the autofluorescence of components in biological samples and test compounds. The assay can detect as low as 3 ng/mL active MMP-2 enzyme. The assay has no cross-reactivity with human MMP-1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16 and has minimal cross-reactivity with MMP-14 (Fig.1).



Scheme 1. The principle of SensoLyte[®] Plus 520 MMP-2 assay kit
MMP-2 in biological samples is captured by pre-coated anti-MMP-2 antibody, and its proteolytic activity measured by 5-FAM/QXL[™] 520 FRET peptide. The fluorescence of 5-FAM (fluorophore) is quenched by QXL[™] 520 (quencher) in the intact FRET peptide. Upon MMP-2 cleavage, the fluorescence of 5-FAM is recovered and can be monitored at Ex/Em=490±20 nm/520± 20 nm.

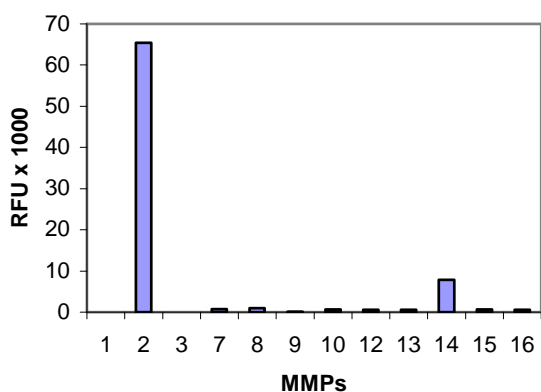


Figure 1. Specificity of SensoLyte® Plus 520 MMP-2 assay kit.

APMA-activated MMPs, 30 ng each, are added to the microplate pre-coated with anti-MMP-2 antibody. After incubation, the plate was washed and the activity of MMPs detected by 5-FAM/QXL™520 FRET peptide substrate. 18 hrs after adding the substrate, fluorescence signal was monitored at Ex/Em=490/520 nm (FlexStation 384II). The reading from all wells was subtracted with the reading from blank control, which contains FRET substrate but no MMPs. (n=3, mean±S.D.)

Protocol

Note: Bring all the kit reagents to room temperature before use.

1. Prepare MMP-2 containing biological samples

1.1 Collect serum, plasma, synovial fluids or supernate of cell culture media and centrifuge for 10-15 min at 1,000x g, 4°C. Collect the supernatant and store at -70°C until use.

1.2 Tissue samples should be homogenized in the assay buffer (Component C) containing 0.1% Triton-X 100, and then centrifuged for 15 min at 10,000x g, 4°C. Collect the supernatant and store at -70°C until use.

Note 1: Triton-X 100 is not provided.

Note 2: Biological samples can be further concentrated or diluted for the experiment depending on the amount of MMPs in the sample. Concentrate samples using a centrifugal filter (Millipore, Cat# UFC905096).

Note 3: During the collection of plasma, anticoagulants containing EDTA or citrate should be avoided. Heparin can be used as anticoagulant.

2. Activate pro-MMP-2 by APMA:

2.1 MMP-2 standard: Dilute MMP-2 standard (10 µg/mL, Component B) 50-fold in assay buffer (Component C) to get a concentration of 200 ng/mL. Incubate pro-MMP-2 with 1 mM APMA for 1 h at 37°C. Activate pro-MMP-2 immediately before the experiment.

2.2 Incubate biological samples with 1 mM APMA for 1 h at 37°C to activate pro-MMP-2. APMA will activate all the pro-MMP-2 in your samples. If measuring endogenous active form of MMP-2 alone, APMA activation step can be omitted.

Note 1: Keep activated enzyme on ice. Avoid vigorously vortexing the enzyme. Prolonged storage of activated enzyme will further de-activate the enzyme.

Note 2: APMA belongs to the organic mercury class of compounds and must be handled with care! Dispose according to appropriate regulations.

Note 3: Activation of zymogen by APMA at higher protein concentration is preferred. After activation, the enzyme can be further diluted.

3. Prepare MMP-2 standard and samples

3.1 Dilute activated MMP-2 standard from step 2.1: use six 2-fold serial dilutions in assay buffer. Prepare a blank control, which contains assay buffer only without MMP-2.

3.2 MMP-2 biological samples: Dilute APMA activated samples as needed.

4. Pull down MMP-2 by antibody coated microplate

4.1 Add 100 µL/well MMP-2 standards, samples, and blank control to the microplate pre-coated with monoclonal anti-human MMP-2 antibody (Component A). Cover the plate with adhesive cover strip (Component H) to prevent evaporation. Incubate the plate on a plate shaker (40-100 rpm) at RT for 2 hrs.

4.2 Dilute 10X wash buffer (Component D) to 1X in deionized water. Wash wells with 200 µL 1X wash buffer for four times.

5. Measure MMP-2 activity by 5-FAM/QXL™ 520 peptide substrate

5.1 MMP-2 substrate solution: Dilute MMP-2 substrate (Component F) 200-fold in assay buffer (Component C). Refer to Table 1. If not using the entire plate, dilute only the amount needed for the experiment.

Table 1. Substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
MMP-2 substrate (Component F)	50 µL
Assay buffer (Component C)	9950 µL
Total volume	10 mL

5.2 Add 100 µL/well diluted MMP-2 substrate solution to the plate.

5.3 Measure fluorescence signal:

Cover the plate with adhesive cover strip (Component H) to prevent evaporation. Incubate the reaction at RT in dark for 1 h to 24 hrs, then measure fluorescence intensity at Ex/Em=490 nm/520 nm. Optional: 100 µL/well stop solution (Component G) can be added before taking the end-point reading.

6. Data analysis: Refer to appendix I.

Appendix I. Data Analysis

- The fluorescence reading from the blank control well represents the background fluorescence. Subtract this background reading from the readings of the other wells to get the relative fluorescence unit (RFU).
- For kinetics reading:
 - Plot data as RFU versus time for each sample.
 - Determine the slope of the linear portion of the data plot. Obtain the reaction velocity (V) in RFU/min or RFU/sec.
 - Plot V versus the concentration of MMP.
- For endpoint reading:
 - Plot data as RFU versus concentration of MMP (Figure 2).

Note: TIMPs are able to bind and inactivate active form of MMP-2. The level of TIMPs in the biological samples may need to be determined in order to correctly interpret data.

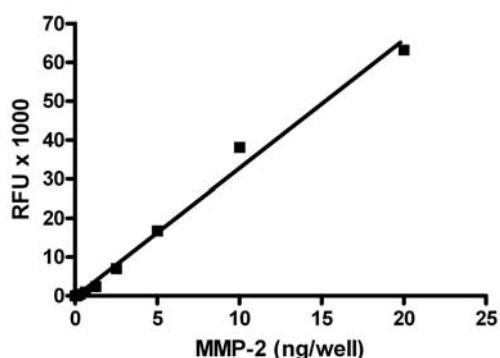


Figure 2. Sensitivity of the SensoLyte® Plus 520 MMP-2 assay.

Recombinant pro-MMP-2 was activated by APMA, and then serially diluted and added to the plate pre-coated with anti-MMP-2 antibody. Its activity was measured by cleavage of the 5-FAM/QXL™ 520 FRET peptide. Fluorescence signal was monitored at Ex/Em =490/520 nm (FlexStation 384II). Endpoint reading (RFU) at 18 hrs versus the amount of MMP-2 was plotted.

Reference:

1. Woessner, JF. Jr. et al. *J Biol Chem* **263**, 16918 (1988).
2. Woessner, JF. Jr. *FASEB J* **5**, 2145 (1991).
3. Freije, JM. et al. *J Biol Chem* **269**, 16766 (1994).
4. Stryer, L. *Annu Rev Biochem* **47**, 819 (1978).
5. Fang, T. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3884 (2000).
6. Schmalfeldt, B. et al. *Clin Cancer Res* **7**, 2396 (2001).
7. Deryugina, EI. et al. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 9 (2006).
8. Zuker, S. et al. *Cancer Biol Ther* **8**, 2371 (2009).
9. Fingleton, B. *Current Pharmaceutical Design* **13**, 333 (2007).

Revised: June 12, 2013

Лого на AnaSpec

SensoLyte® Plus 520 MMP-2 Assay Kit *Fluorimetric and Enhanced Selectivity*

Каталожен №	72224
Обем на кита	96 анализа в 96-ямкова плака
Изпълнение:	Оптимизирани условия за специфична детекция на активността на MMP-2
Enhanced Value:	Предоставени са реактиви за 100 теста в 96-ямков формат
Assured Reliability:	Предоставени са подробен протокол и референции

Състав на кита

Компонент	Описание	Количество
Компонент А	Микроплака, покрита с моноклонално анти-човешко MMP-2 анти тяло	12 x 8 черни стрипа
Компонент В	MMP-2 стандарт, рекомбинантен човешки pro-MMP-2	10 µg/mL, 15µL
Компонент С	Буфер за анализ	50 mL
Компонент D	10X миеш буфер	50 mL
Компонент E	APMA, 4-aminophenylmercuric acetate <i>Внимание: Съдържа органичен живак. Изхвърляйте съгласно вашите местни закони</i>	100 mM, 150 µL
Компонент F	MMP-2 субстрат 5-FAM/QXL™ 520 FRET пептид Ex/Em=490 nm/520 nm след разграждане	50 µL
Компонент G	Стопиращ разтвор	10 mL
Компонент H	Адхезивно фолио за покриване	3 листа

Съхранение и работа

Съхранявайте всички компоненти на кита, с изключение на Компонент В, при -20°C.

Съхранявайте компонент В при -80°C.

За удобство, Компоненти D, G, и H могат да бъдат съхранявани на стайна температура

Introduction

.....

Протокол

1. Подготовка на биологични проби, съдържащи MMP-2

1.1. Съберете серума, плазма, синовиална течност или супернатанта от клетъчни култури и центрофугирайте за 10-15 мин. при 1,000x g, 4°C. Съберете супернатантата и я съхранявайте при -70°C до употреба.

1.2. Тъканните проби трябва да бъдат хомогенизирани в буфера за анализ (Компонент С) съдържащ 0.1% Triton-X 100, и тогава центрофугирани за 15 мин. при 10,000x g, 4°C. Съберете супернатантата и я съхранявайте при -70°C до употреба.

Забележка 1: Triton-X 100 не е предоставен.

Забележка 2: Биологичните проби могат да бъдат концентрирани или разреждени в зависимост от количеството на MMPs в пробата. Концентрирайте пробите използвайки центрофужен филтър (Millipore, Cat# UFC905096).

Забележка 3: По време на събирането на плазмата, трябва да се избягват антикоагуланти, съдържащи EDTA или цитрат. Като антикоагулант може да се използва хепарин.

2. Активиране на pro-MMP-2 посредством APMA:

2.1. MMP-2 стандарт: Разреждете MMP-2 стандарт (10 µg/mL, Компонент В) 50-пъти в буфера за анализ (Компонент С) за да получите концентрация of 200 ng/mL. Инкубирайте pro-MMP-2 с

1 mM APMA за 1 час на 37°C. Активирайте pro-MMP-2 непосредствено преди експеримента.

2.2. Инкубирайте биологичните проби с 1 mM APMA за 1 час на 37°C за да активирате pro-MMP-2. APMA ще активира всички pro-MMP-2 във вашите проби. Ако измервате само ендогенната активна форма на MMP-2, стъпката с активиране с APMA може да се пропусне.

Забележка 1: Поставете активираните ензими на лед. Избягвайте силното вортексиране на ензима. Продължителното съхраняване на активирания ензим ще де-активира ензимът.

Забележка 2: APMA спада към органичния живак и с него трябва да се работи внимателно! Изхвърлете съгласно съответните закони.

Забележка 3: За предпочитане е активиране на зимогена чрез APMA при висока протеинова концентрация. След активация ензимът по-нататък може да бъде разреден.

3. Подготовка на MMP-2 стандарт и проби

3.1. Разрежете активирания MMP-2 стандарт: използвайте шест 2-пъти серийни разреждания в буфер за анализ. Пригответе бланкираща контрола, която съдържа само буфер за анализ, без MMP-2.

3.2 MMP-2 биологични проби: Разрежете активираните с APMA проби както е необходимо.

4. Захващане на MMP-2 от антиялото на микротитърната плака

4.1. Добавете 100 µL/ямка MMP-2 стандарти, проби и бланкиращата контрола в микротитърната плака, предварително покрита с моноклонално анти-човешко MMP-2 антияло (Компонент А). Покрийте плаката с адхезивното фолио за покриване (Компонент Н) за предотвратяване на изпаряване. Инкубирайте плаката върху шейкър за плаки (40-100 rpm) за 2 часа на стайна температура.

4.2. Разрежете 10X миешия буфер (Компонент D) до 1X в дейонизирана вода. Измийте ямките с 200 µL 1X миеш буфер четири пъти.

5. Измерване активността на MMP-2 чрез 5-FAM/QXL™ 520 пептиден субстрат

5.1. MMP-2 субстратен разтвор: Разрежете MMP-2 субстрата (Компонент F) 200-пъти в буфер за анализ (Компонент С). Вижте Таблица 1. Ако няма да ползвате цялата плака, разрежете само количество, необходимо за експеримента.

Таблица 1. Субстратен разтвор за една 96-ямкова плака (100 анализа)

Компоненти	Обем
MMP-2 субстрат (Компонент F)	50 µL
Буфер за анализ (Компонент С)	9950 µL
Общ обем	10 mL

5.2. Добавете 100 µL/ямка разреден MMP-2 субстратен разтвор.

5.3. Измерете флуоресцентния сигнал:

Покрийте плаката с адхезивното фолио (Компонент Н) за да избегнете изпаряване. Инкубирайте на стайна температура на тъмно от 1 до 24 часа, след което измерете интензитета на флуоресценция при Ex/Em=490 nm/520 nm.

Опция: За end-point измерване може да добавите 100 µL/ямка стопиращ разтвор (Компонент G).

6. Анализ на данните:

Прочетената флуоресценция от бланкиращата ямка ще представи фоновата флуоресценция. Извадете тази стойност от стойността на флуоресценцията в останалите ямки и ще получите относителни флуоресцентни единици (RFU).

- За кинетично измерване:
 - ✓ Съпоставете данните от RFU спрямо времето на всяка проба.
 - ✓ Засечете стойността върху стандартната права. Получете скоростта на реакцията (V), изразена в RFU/мин или RFU/сек.
 - ✓ Засечете V спрямо концентрацията на MMP.
- За крайно измерване:
 - ✓ Засечете данните като RFU спрямо концентрацията на MMP.

Забележка: TIMPs може да свържат и инактивират активната форма на MMP-2. Нивата на TIMPs в биологичните проби е необходимо да бъдат определени за коректно интерпретиране на резултатите



SensoLyte[®] Plus 520 MMP-9 Assay Kit

Fluorimetric and Enhanced Selectivity

Catalog #	72017
Kit Size	96 Assays in 96-well plate

- **Optimized Performance:** Optimal conditions for detecting MMP-9 activity in biological samples.
- **Enhanced Value:** Less expensive than the sum of individual components.
- **Assured Reliability:** Detailed protocol and references are provided.

Kit Components, Storage and Handling

Component	Description	Quantity
Component A	Microplate coated with monoclonal anti human MMP-9 antibody	12 X 8 black strips
Component B	MMP-9 standard, recombinant human proMMP-9	10 µg/mL, 10 µL
Component C	MMP dilution buffer	5 mL
Component D	10 X Wash buffer	50 mL
Component E	APMA, 4-aminophenylmercuric acetate <i>Caution: Contain organic mercury. Dispose it according to your local regulations.</i>	100 mM, 150 µL
Component F	MMP-9 substrate, 5-FAM/QXL [™] 520 FRET peptide Ex/Em=490 nm/520 nm upon cleavage	50 µL
Component G	Assay buffer	50 mL
Component H	Stop Solution	10 mL
Component I	Adhesive cover strip	3 sheets

Other Materials Required (but not provided)

- Fluorescence microplate reader: Capable of detecting emission at 520 nm with excitation at 490 nm.

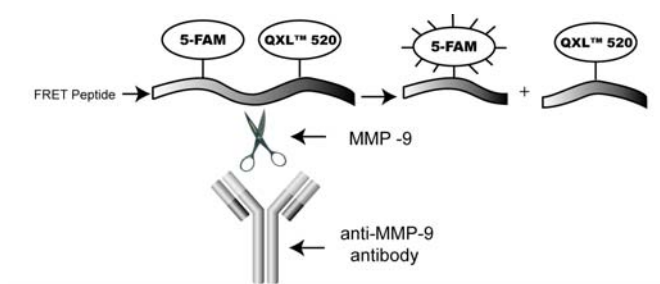
Storage and Handling

- Store all kit components, except Component B, at -20°C.
- Store Component B at -80°C.
- For convenience, Components D, G, H, I can be stored at RT.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a family of secreted or membrane-associated zinc endopeptidases capable of digesting extracellular matrix components^{1,2}. The importance of MMPs in tumor development and invasion as well as other diseases is well known. MMP-9 (92-kDa gelatinase, collagenase-IV)^{3,4} is involved in a number of diseases such as cancer, angiogenesis, alopecia, and metastasis. It is proposed as a therapeutic target for these diseases. Latent 92 kDa MMP-9 can be activated to the 82 and 65 kDa active forms.

The SensoLyte[®] Plus 520 MMP-9 Assay Kit is designed for specifically detecting MMP-9 activity in biological samples, such as culture medium, serum, plasma, synovial fluid, and tissue homogenate, which may contain multiple MMPs. Members of the MMP family have poor substrate sequence specificity, making it difficult to use a peptide substrate alone to differentiate the activity of a particular MMP from other MMPs. A monoclonal anti-human-MMP-9 is therefore used to pull down both pro and active forms of MMP-9 from the mixture first, and the activity of MMP-9 is then quantified using a 5-FAM/QXL[™]520 fluorescence resonance energy transfer (FRET)⁵ peptide (Scheme 1). Compared to a Mca/Dnp FRET substrate, this 5-FAM/QXL[™]520 substrate shows less interference from the autofluorescence of cellular components and also provides better assay sensitivity. The assay can detect as low as sub-nanogram level of active human MMP-9 without cross-reactions with human MMP-1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 13, and 14 (Figure 1).



Scheme 1. The principle of SensoLyte[®] Plus 520 MMP-9 assay kit.

MMP-9 in biological samples is captured by immobilized MMP-9 antibodies, and its proteolytic activity is measured by the 5-FAM/QXL[™]520 FRET peptide. Fluorescence of 5-FAM (fluorophore) is quenched by QXL[™]520 (quencher) in the intact FRET peptide. Upon MMP-9 cleavage, the fluorescence of 5-FAM is recovered and can be monitored at Ex/Em=490±20 nm/520±20 nm.

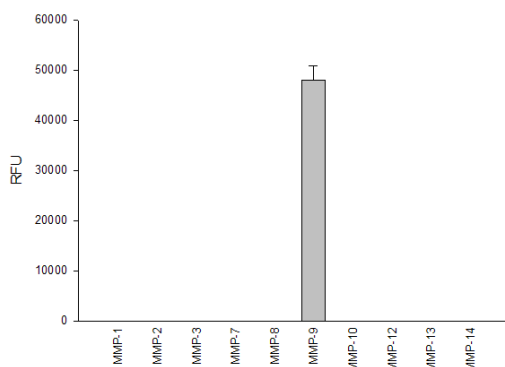


Figure 1. The specificity of SensoLyte[®] Plus 520 MMP-9 assay kit.

APMA-activated MMPs, 30 ng each, are added to the microplate pre-coated with anti-MMP-9. After incubation, the plate was washed and the activity of MMPs detected by adding 5-FAM/QXL[™]520 FRET peptide substrate. The fluorescence signal was monitored in 1 hr after adding the substrate at the excitation wavelength of 490 nm and emission of 520 nm, with cut off at 515 nm (FlexStation 384II). The reading from all wells was subtracted with the reading from blank control, which contains FRET substrate but no MMPs. (n=3, mean±S.D.)

Protocol

Note: Warm all the kit reagents to room temperature before use.

1. Prepare MMP-9 containing biological samples

1.1 Collect serum, plasma, synovial fluids or supernate of cell culture media (e.g. stimulated fibroblast) and centrifuge for 10-15 min at 1000X g, 4°C. Collect the supernatant and store at -70°C until use.

1.2 Tissue samples should be homogenized in the assay buffer (Component G) containing 0.1% Triton-X 100, and then centrifuged for 15 min at 10,000x g at 4°C. Collect the supernatant and store at -70°C until use.

Note 1: Triton-X 100 is provided by the customer.

Note 2: Biological samples can be further concentrated or diluted for the next step depending on the amount of MMPs in the sample. Samples can be concentrated by a centrifugal filter (Millipore, Cat# 42407).

Note 3: During the collection of plasma, anticoagulants containing EDTA or citrate should be avoided. Heparin may be used as anticoagulant.

2. Pull down MMP-9 by antibody coated microplate

2.1 MMP-9 standard: Add 10 µL MMP-9 standard (10 µg/mL, Component B) to 490 µL MMP dilution buffer (Component C) to get a concentration of 200 ng/mL. Then do six 2-fold serial dilutions in MMP dilution buffer. Prepare a blank control, which contains MMP dilution buffer only without MMP-9.

Note: Do not vortex the enzyme solution! Keep enzyme on ice before use.

2.2 Add 100 µL/well samples, MMP-9 standards, and blank control to the microplate coated with monoclonal anti-human MMP-9 (Component A). Cover the plate with adhesive cover strip (Component I) to prevent evaporation. Incubate the plate on a plate shaker (100-200 rpm) at room temperature for 1 hr.

2.3 Dilute 10X wash buffer (Component D) to 1X in deionized water. Wash the wells with 200 µL 1X wash buffer four times.

3. Activate pro-MMP 9 by APMA

3.1 Dilute 100 mM APMA (Component E) in assay buffer (Component G) to 1 mM. Add 100 µL of 1 mM APMA per well. Cover the plate with adhesive cover strip (Component I) to prevent evaporation. Incubate the plate at 37°C for 2 hrs.

Note 1: APMA will activate all the pro-MMP-9 in your sample. If you want to measure endogenous active form of MMP-9 alone, this APMA activation step can be omitted.

Note 2: The MMP-9 standard contains mainly zymogen. APMA activation must be performed.

Note 3: If 1 mM APMA looks cloudy, incubate it at 37°C water bath for 10-30 min.

3.2 Wash the wells with 200 µL 1X wash buffer for four times.

4. Measure MMP-9 activity by 5-FAM/QXL™ peptide 520 substrate

4.1 MMP-9 substrate solution: Dilute MMP-9 substrate (Component F) 200-fold in assay buffer (Component G).

Table 1. MMP-9 substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
MMP-9 substrate (Component F)	50 µL
Assay buffer (Component G)	10 mL
Total volume	10 mL

4.2 Add 100 μ L/well MMP-9 substrate solution to all wells, including MMP-9 standard, samples, and blank control.

4.3 Measure fluorescence signal:

For kinetic reading: Immediately start measuring fluorescence intensity at Ex/Em=490 nm/520 nm continuously and record data every 10 minutes for 60-120 min.

For end-point reading: Cover the plate with adhesive cover strip (Component I) to prevent evaporation. Incubate the reaction at room temperature in the dark for 60 min to 16 h, then measure fluorescence intensity at Ex/Em=490 nm/520 nm. Optional: 100 μ L/well stop solution (Component H) can be added before taking the end-point reading.

5. Data analysis: Refer to Appendix I.

Appendix I. Data Analysis

- The fluorescence reading from the blank control well represents the background fluorescence. Subtract this background reading from the readings of the other wells to get the relative fluorescence unit (RFU).
- For kinetics reading:
 - Plot data as RFU versus time for each sample.
 - Determine the slope of the linear portion of the data plot. Obtain the reaction velocity (V) in RFU/min or RFU/sec.
 - Plot V versus the concentration of MMP.
- For endpoint reading:
 - Plot data as RFU versus concentration of MMP (Figure 2).

Note: TIMPs are able to bind and inactivate active form of MMP-9. The level of TIMPs in the biological samples may need to be determined in order to correctly interpret the data.

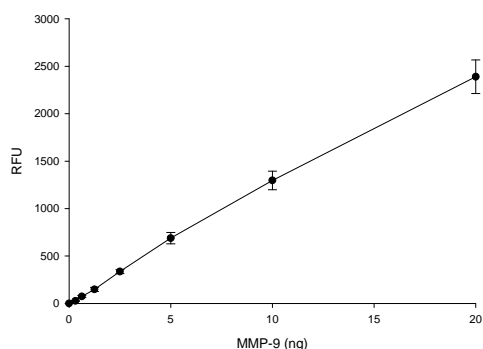


Figure 2. Sensitivity of the SensoLyte[®] Plus 520 MMP-9 assay.

Recombinant pro-MMP-9 was serially diluted and added to plate coated with anti-MMP-9 antibody. Pro-MMP-9 was activated by APMA and its activity measured by the 5-FAM/QXL[™]520 FRET peptide. Fluorescence signal was monitored with a filter set of excitation/emission=485 \pm 20 nm/528 \pm 20 nm (Bio-Tek FLx800). Endpoint reading (RFU) at 2h versus the amount of MMP-9 was plotted. The assay was able to detect as low as 0.3 ng of enzyme. (n=3, mean \pm S.D.)

References

1. Woessner, JF. Jr. et al. *J Biol Chem* **263**, 16918 (1988).
2. Woessner, JF. Jr. *FASEB J* **5**, 2145 (1991).
3. Wilhelm, SM. et al., *J Biol Chem* **264**, 17213 (1989).
4. Fosang, AJ. et al. *Biochem J* **295**, 273 (1993).
5. Stryer, L. *Annu Rev Biochem* **47**, 819 (1978).

Лого на AnaSpec

SensoLyte® Plus 520 MMP-9 Assay Kit

Fluorimetric and Enhanced Selectivity

Каталожен №	72017
Обем на кита	96 анализа в 96-ямкова плака
Изпълнение:	Оптимизирани условия за специфична детекция на активността на MMP-9
Enhanced Value:	По-евтин в сравнение с индивидуалните компоненти
Assured Reliability:	Предоставени са подробен протокол и референции

Състав на кита

Компонент	Описание	Количество
Компонент А	Микроплака, покрита с моноклонално анти-човешко MMP-9 антияло	12 x 8 черни стрипа
Компонент В	MMP-9 стандарт, рекомбинантен човешки рго-MMP-9	10 µg/mL, 15µL
Компонент С	Буфер за анализ	50 mL
Компонент D	MMP буфер за разреждане	5 mL
Компонент E	10X миеш буфер	50 mL
Компонент F	APMA, 4-aminophenylmercuric acetate <i>Внимание: Съдържа органичен живак. Изхвърляйте съгласно вашите местни закони</i>	100 mM, 150 µL
Компонент G	MMP-9 субстрат 5-FAM/QXL™520 FRET пептид Ex/Em=490 nm/520 nm след разграждане	50 µL
Компонент H	Стопиращ разтвор	10 mL
Компонент I	Адхезивно фолио за покриване	3 листа

Съхранение и работа

Съхранявайте всички компоненти на кита, с изключение на Компонент В, при -20°C.

Съхранявайте компонент В при -80°C.

За удобство, Компоненти D, G, H и I могат да бъдат съхранявани на стайна температура

Introduction

.....

Протокол**1. Подготовка на биологични проби, съдържащи MMP-9**

1.1. Съберете серума, плазма, синовиална течност или супернатанта от клетъчни култури и центрофугирайте за 10-15 мин. при 1,000x g, 4°C. Съберете супернатантата и я съхранявайте при -70°C до употреба.

1.2. Тъканните проби трябва да бъдат хомогенизирани в буфера за анализ (Компонент С) съдържащ 0.1% Triton-X 100, и тогава центрофугирани за 15 мин. при 10,000x g, 4°C. Съберете супернатантата и я съхранявайте при -70°C до употреба.

Забележка 1: Triton-X 100 не е предоставен.

Забележка 2: Биологичните проби могат да бъдат концентрирани или разреждени в зависимост от количеството на MMPs в пробата. Концентрирайте пробите използвайки центрофужен филтър (Millipore, Cat# UFC905096).

Забележка 3: По време на събирането на плазмата, трябва да се избягват антикоагуланти, съдържащи EDTA или цитрат. Като антикоагулант може да се използва хепарин.

2. Захващане на MMP-2 от антиялото на микротитърната плака

2.1. MMP-9 стандарт: Добавете 10 µL MMP-9 стандарт (10 µg/mL, Компонент В) с 490 µL MMP

буфера за разреждане (Компонент С) за да получите концентрация of 200 ng/mL. Направете 2-кратно разреждане с MMP буфер за разреждане. Подгответе бланкираща контрола, която съдържа само MMP буфер за разреждане.

2.2. Добавете 100 μ L/ямка MMP-9 стандарти, проби и бланкиращата контрола в микротитърната плака, предварително покрита с моноклонално анти-човешко MMP-9 антитяло (Компонент А). Покрийте плаката с адхезивното фолио за покриване (Компонент I) за предотвратяване на изпаряване. Инкубирайте плаката върху шейкър за плаки (40-100 rpm) за 2 часа на стайна температура.

2.3. Разрежете 10X миещия буфер (Компонент D) до 1X в дейонизирана вода. Измийте ямките с 200 μ L 1X миеш буфер четири пъти.

3. Активиране на pro-MMP-9 посредством APMA:

3.1. Разрежете 100 mM APMA (Компонент E) в буфер за анализ (Компонент G) до 1 mM.

Добавете 100 μ L от 1 mM APMA на ямка. Покрийте плаката с адхезивно фолио (Компонент I) за предотвратяване на изпаряване. Инкубирайте на 37°C за 2 часа.

Забележка 1: APMA ще активира всички pro-MMP-9 във вашите проби. Ако измервате само ендогенната активна форма на MMP-9, стъпката с активиране с APMA може да се пропусне.

Забележка 2: MMP-9 стандарта съдържа главно зимогени. Необходимо е да се извърши активиране с APMA.

Забележка 3: За предпочитане е активиране на зимогена чрез APMA при висока протеинова концентрация. След активация ензимът по-нататък може да бъде разреден.

3.2. Ако 1 mM APMA изглежда мътен, инкубирайте го на 37°C на водна баня за 10-30 мин.

4. Измерване активността на MMP-9 чрез 5-FAM/QXL™ 520 пептиден субстрат

4.1. MMP-9 субстратен разтвор: Разрежете MMP-9 субстрата (Компонент F) 200-пъти в буфер за анализ (Компонент G).

Таблица 1. MMP-9 Субстратен разтвор за една 96-ямкова плака (100 анализа)

Компоненти	Обем
MMP-9 субстрат (Компонент F)	50 μ L
Буфер за анализ (Компонент G)	10 mL
Общ обем	10 mL

4.2. Добавете 100 μ L/ямка разреден MMP-9 субстратен разтвор, включвайки MMP-9 стандарт, проби и бланкираща контрола.

4.3. Измерете флуоресцентния сигнал:

- За кинетично измерване: Незабавно започнете измерването на флуоресцентния интензитет при Ex/Em=490 nm/520 nm постоянно и записвайте данните на всеки 10 мин в рамките на 60-120 мин.

- За крайно измерване: Покрийте плаката с адхезивното фолио (Компонент I) за да избегнете изпаряване. Инкубирайте на стайна температура на тъмно от 60 мин. до 16 часа, след което измерете интензитета на флуоресценция при Ex/Em=490 nm/520 nm.

Опция: За end-point измерване може да добавите 100 μ L/ямка стопиращ разтвор (Компонент H).

5. Анализ на данните:

Прочетената флуоресценция от бланкиращата ямка ще представи фоновата флуоресценция. Извадете тази стойност от стойността на флуоресценцията в останалите ямки и ще получите относителни флуоресцентни единици (RFU).

- За кинетично измерване:

- ✓ Съпоставете данните от RFU спрямо времето на всяка проба.

- ✓ Засечете стойността върху стандартната права. Получете скоростта на реакцията (V), изразена в RFU/мин или RFU/сек.

- ✓ Засечете V спрямо концентрацията на MMP.

- За крайно измерване:

- ✓ Засечете данните като RFU спрямо концентрацията на MMP.

Забележка: TIMPs може да свържат и инактивират активната форма на MMP-9. Нивата на

TIMPs в биологичните проби е необходимо да бъдат определени за коректно интерпретиране на резултатите



SensoLyte[®] 520 Neprilysin Activity Assay Kit **Fluorimetric**

Catalog #	72223
Kit Size	100 Assays (96-well plate)

- **Optimized Performance:** This kit is optimized to detect neprilysin enzyme activity.
- **Enhanced Value:** It provides ample reagents to perform 100 assays in a 96-well plate format.
- **High Speed:** The entire process can be completed in one hour.
- **Assured Reliability:** Detailed protocol and references are provided.

Kit Components, Storage and Handling

Component	Description	Quantity
Component A	5-FAM/QXL [™] 520 Neprilysin substrate, Ex/Em=490/520 nm upon cleavage	1 mM, 50 μ L
Component B	5-FAM, fluorescence reference standard, Ex/Em=490/520 nm	1 mM, 15 μ L
Component C	Recombinant human neprilysin	25 μ g/mL, 40 μ L
Component D	2X Assay Buffer	30 mL
Component E	Inhibitor	0.1 mM, 15 μ L

Other Materials Required (but not provided)

- 96-well microplate: Black, flat-bottom, 96-well plate with non-binding surface.
- Fluorescence microplate reader: Capable of detecting emission at 520 nm with excitation at 490 nm.

Storage and Handling

- Store all kit components at -20°C, except for Component C.
- Store Component C at -80°C.
- Protect Components A and B from light and moisture.
- Component D can be stored at room temperature for convenience.

Introduction

Neprilysin (NEP) is a transmembrane metallopeptidase normally expressed by a variety of tissues.^{1,2} It is also known as neutral endopeptidase, and enkephalinase. NEP cleaves peptides at the N-terminal side of hydrophobic amino acid residues and is responsible for the degradation and inactivation of a variety of physiological substrates.³ NEP is a major extracellular amyloid beta-peptide degrading enzyme in the brain.^{4,5} Consequently, targeting NEP is considered a potential therapeutic strategy for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.^{4,5} NEP has also been implicated in the pathogenesis of hypertension, diabetes, and cancer.⁶⁻⁸

The SensoLyte[®] 520 Neprilysin Assay Kit employs a novel internally quenched 5-FAM/QXL[™] 520 FRET substrate for the detection of neprilysin activity. The enzyme cleaves the FRET substrate into two separate fragments resulting in the release of 5-FAM fluorescence, which can be monitored at excitation/emission= 490/520 nm. The long wavelength fluorescence of 5-FAM is less interfered by the autofluorescence of components in biological samples and test compounds.

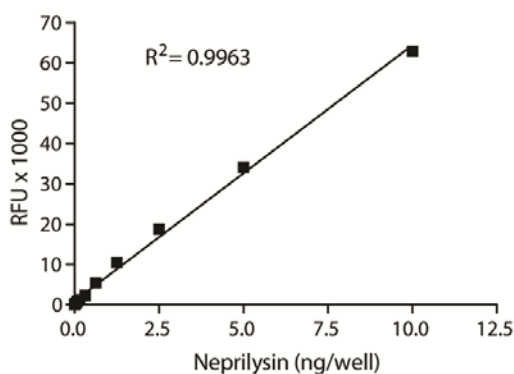


Figure 1. Sensitivity of the assay has been tested using serial dilutions of recombinant human neprilysin. 5-FAM/QXL[™] 520 FRET substrate was incubated with the indicated amount of enzyme and fluorescence was measured after 60 min (FlexStation 384II, Molecular Devices). This assay can detect as low as 0.78 ng/mL of active neprilysin.

Protocol

Note 1: To prepare a standard curve, please refer to Appendix II (optional).

Note 2: Please use Protocol A or B based on your needs.

Protocol A. Screening compounds using purified enzyme.

1. Prepare working solutions.

Note: Bring all kit components until thawed to room temperature before starting the experiments.

1.1 1X assay buffer: Add 10 mL of 2X assay buffer (Component D) to 10 mL of deionized water.

1.2 Neprilysin substrate solution: Dilute neprilysin substrate (Component A) 100-fold in 1X assay buffer. Refer to Table 1. For each experiment, prepare fresh substrate solution. If not using the entire plate, adjust the amount of substrate to be diluted accordingly.

Table 1. Neprilysin substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
Neprilysin (Component A)	50 μ L
1X assay buffer	4.95 mL
Total volume	5 mL

1.3 Neprilysin diluents: Dilute neprilysin enzyme (Component C) 100-fold in 1X assay buffer. This amount of enzyme is enough for a full 96-well plate. If not using the entire plate, adjust the amount of enzyme to be diluted accordingly.

Note: Prepare enzyme diluents immediately before use. Do not vortex the enzyme solution. Prolonged storage or vigorous agitation of the diluted enzyme will cause denaturation. Store the enzyme solution on ice.

1.4 Neprilysin inhibitor (Thiorphan): Dilute the 0.1 mM inhibitor solution (Component E) 100-fold in 1X assay buffer to get 1.0 μ M inhibitor solution. Add 10 μ l of the diluted inhibitor solution into each of the inhibitor control well.

2. Set up the enzymatic reaction.

2.1 Add test compounds and diluted enzyme solution to the microplate wells. The suggested volume of enzyme solution for one well of a 96-well plate is 40 μ L and test compound is 10 μ L.

2.2 Simultaneously set up the following control wells as deemed necessary:

- **Positive control** contains the diluted neprilysin without test compound.
- **Inhibitor control** contains the diluted neprilysin and inhibitor.
- **Vehicle control** contains enzyme and vehicle used in delivering test compound (e.g. DMSO, concentration not to exceed 1%).
- **Test compound control** contains 1X assay buffer and test compound. Some test compounds have strong autofluorescence and may give false results.
- **Substrate control** contains 1X assay buffer.

2.3 Using the 1X assay buffer, bring the total volume of all controls to 50 μ L.

2.4 Optional: Pre-incubate the plate for 10 min. at assay temperature. Any temperature (the *assay temperature*) from room temperature to 37°C may be used, as long as the subsequent incubations are performed at the same temperature.

3. Run the enzymatic reaction.

3.1 Add 50 μ L of the neprilysin substrate solutions into each well. For best accuracy, it is advisable to have the substrate solution equilibrated to the *assay temperature*. Mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec.

3.2 Measure fluorescence signal:

- **For kinetic reading:** Immediately start measuring fluorescence at Ex/Em=490 nm/520 nm continuously and record data every 5 min for 30 to 60 min.
- **For end-point reading:** Incubate the reaction for 30 to 60 min. Keep plate from direct light. Mix the reagents and measure fluorescence intensity at Ex/Em=490 nm/520 nm.

3.3 For methods of data analysis: Refer to Appendix I.

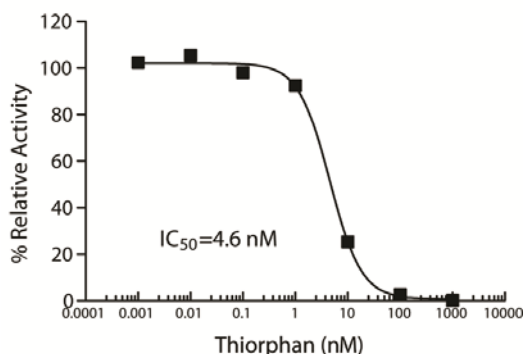


Figure 2. Inhibition of neprilysin activity by Thiorphan as measured with SensoLyte® 520 Neprilysin Assay Kit.

Protocol B. Measuring neprilysin activity in biological samples.

1. Prepare neprilysin containing biological samples.

1.1 Prepare cell extract samples:

- Collect cells and wash cell pellets with phosphate buffered saline (PBS).
- Lyse cells, and centrifuge at 15,000x g for 5 min, 4°C.
- Collect the supernatant and store at -70°C until use.

1.2 Prepare tissue extract samples:

- Collect tissues.
- Homogenize tissue samples, and centrifuge at 15,000x g for 5 min at 4°C.
- Collect the supernatant and store at -70°C until use.

Note 1: PBS is not provided. Cell or tissue extract should be diluted and used as the enzyme source to measure neprilysin activity.

Note 2: It is optional to use the assay buffer (1X) for preparation of biological samples. If using the assay buffer provided in this kit, the neprilysin substrate (Component A) should be diluted in 1X assay buffer instead of 2X assay buffer.

2. Prepare working solutions.

Note: Bring all kit components until thawed to room temperature before starting the experiments.

2.1 The neprilysin substrate solution: Dilute neprilysin substrate (Component A) 100-fold in 2X assay buffer (Component D). Refer to Table 1. If not using the entire plate, adjust the amount of substrate to be diluted accordingly.

Table 1. Neprilysin substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
Neprilysin substrate (Component A)	50 µL
2X assay buffer (Component D)	4.95 mL
Total volume	5 mL

3. Set up the enzymatic reaction.

3.1 Add 50 µL of neprilysin containing sample.

3.2 Set up the following control wells at the same time as deemed necessary:

- Positive control contains purified active neprilysin.
- Substrate control contains deionized water.

3.3 Bring the total volume of all controls to 50 μ L.

3.4 Optional: Pre-incubate the plate for 10 min. at assay temperature. Any temperature (the *assay temperature*) from room temperature to 37°C may be used, as long as the subsequent incubations are performed at the same temperature.

4. Run the enzymatic reaction.

4.1 Add 50 μ L of the neprilysin substrate solutions into each well. For best accuracy, it is advisable to have the substrate solution equilibrated to the assay temperature. Mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec.

4.2 Measure fluorescence signal:

- For kinetic reading: Immediately start measuring fluorescence at Ex/Em=490 nm/520 nm continuously and record data every 5 min for 30 to 60 min.
- For end-point reading: Incubate the reaction for 30 to 60 min. Keep plate from direct light. Mix the reagents and measure fluorescence intensity at Ex/Em=490 nm/520 nm.

4.3 For methods of data analysis: Refer to Appendix I.

Appendix I. Data Analysis

- The fluorescence reading from the substrate control well is used as the background fluorescence. This background reading should be subtracted from the readings of the other wells containing substrate. All fluorescence readings are expressed in relative fluorescence units (RFU).
- For kinetics analysis:
 - Plot data as RFU versus time for each sample. To convert RFUs to the concentration of the product of the enzymatic reaction, please refer to Appendix II for establishing a fluorescence reference standard.
 - Determine the range of initial time points during which the reaction is linear. Typically, the first 10-15% of the reaction will be the optimal range.
 - Obtain the initial reaction velocity (V_o) in RFU/min by determining the slope of the linear portion of the data plot.
 - A variety of data analyses can be done, e.g., determining inhibition %, EC_{50} , IC_{50} , K_m , K_i , etc.
- For endpoint analysis:
 - Plot data as RFU versus concentration of test compounds.
 - A variety of data analyses can be done, e.g., determining inhibition %, EC_{50} , IC_{50} , etc.

Appendix II. Instrument Calibration

- Fluorescence reference standard: Dilute the 1 mM fluorescence standard solution (Component B) 100-fold to 10 μM in 1X assay buffer. Do 2-fold serial dilutions to get concentrations of 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, and 0.16 μM , include an assay buffer blank. Add 50 μL /well of these serially diluted reference solutions.
- Add 50 μL /well of the diluted neprilysin substrate solution (refer to Protocol A, Step 1.2 for preparation).

Note: The neprilysin substrate solution is added to the reference standard to normalize for the intrinsic substrate fluorescence. If multiple concentrations of substrate are used, this step must be performed for each concentration.

- Measure the fluorescence of the reference standard and substrate control wells at Ex/Em=490 nm/520 nm. Use the same setting of sensitivity as used in the enzyme reaction.
- Plot the reference standard curve as RFU (relative fluorescent units) versus concentration.
- The final concentrations of fluorescence reference standard are 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08, and 0 μM . This reference standard is used to calibrate the variation of different instruments and different experiments. It is also an indicator of the amount of final product of the enzymatic reaction.

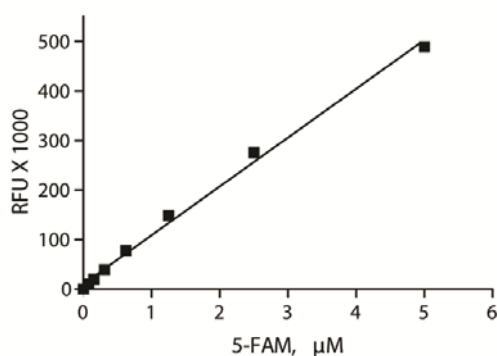


Figure 3. 5-FAM reference standard. 5-FAM standard solution was serially diluted in assay buffer containing substrate, and the fluorescence was recorded at Ex/Em=490/520 nm. (Flexstation 384II, Molecular Devices).

References

1. Turner, AJ. et al. *Bioessays* **23**, 261 (2001).
2. Shipp, MA. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4819 (1988).
3. Connelly, JC. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 8737 (1985).
4. Iwata, N. et al. *Science* **292**, 1550 (2001).
5. Nalivaeva, NN. et al. *Curr Alzheimer Res* **5**, 212 (2008).
6. Ruilope, LM. et al. *Lancet* **375**, 1255 (2010).
7. Zraika, S. et al. *J Biol Chem* **285**, 18177 (2010).
8. Seiler, R. et al. *Hum Pathol* **43**, 269 (2012).

Revised: May 7, 2013

Лого на AnaSpec

SensoLyte® 520 Neprilysin Activity Assay Kit *Fluorimetric*

Каталожен №	72223
Обем на кита	100 анализа в 96-ямкова плака
Изпълнение:	Този кит е оптимизиран за доказване на ензимна активност на неприлизин
Enhanced Value:	Предоставени са реактиви за 100 теста в 96-ямков формат
Висока скорост	Целия процес може да се извърши за 1 час
Assured Reliability:	Предоставени са подробен протокол и референции

Състав на кита

Компонент	Описание	Количество
Компонент А	5-FAM/QXL™ 520 неприлизин субстрат, Ex/Em=490/520 nm при разграждане	1 mM, 50 µL
Компонент В	5-FAM, референтен стандарт за флуоресценция, Ex/Em=490/520 nm	1 mM, 15 µL
Компонент С	Рекомбинантен човешки неприлизин	25 µg/mL, 40 µL
Компонент D	2X буфер за анализ	30 mL
Компонент E	Инхибитор	0.1 mM, 15 µL

Съхранение и работа

Съхранявайте всички компоненти на кита, с изключение на Компонент С, при -20°C.

Съхранявайте компонент С при -80°C.

Пазете Компоненти А и В от светлина или влага

За удобство, Компоненти D може да се съхранява на стайна температура

Introduction

.....

Протокол

1. Подготовка на биологични проби, съдържащи Неприлизин

1.1. Подготовка на клетъчни екстракти:

- Съберете клетките и измийте утайката в PBS
- Лизирайте клетките и центрофугирайте на 15000x g за 5 мин на 4°C
- Съберете супернатантата и съхранете на -70°C до употреба

1.2. Подготовка на тъканни екстракти:

- Съберете тъканите
- Хомогенизирайте тъканите и центрофугирайте на 15000x g за 5 мин на 4°C
- Съберете супернатантата и съхранете на -70°C до употреба

2. Подготовка на работни разтвори:

2.1. Неприлизин субстратен разтвор: Разрежете Неприлизин субстрата (Компонент А) 100-пъти в 2X буфер за анализ (Компонент D). Вижте Таблица 1. Ако няма да ползвате цялата плака, разрежете само количество, необходимо за експеримента.

Таблица 1. Неприлизин субстратен разтвор за една 96-ямкова плака (100 анализа)

Компоненти	Обем
Неприлизин субстрат (Компонент А)	50 μ L
2X Буфер за анализ (Компонент D)	4.950 mL
Общ обем	5 mL

3. Подготовка на ензимната реакция

3.1. Добавете 50 μ L проба, съдържаща неприлизин

3.2. Заложете следните контроли:

- Положителна контрола, съдържаща пречистен активен неприлизин
- Субстратна контрола, съдържаща дейонизирана вода

3.3. Доведете всички контроли до 50 μ L

3.4. Опция: Преинкубирайте плаката за 10 мин. при температура за анализ

4. Стартиране на ензимната реакция

4.1. Добавете 50 μ L от субстратния разтвор на Неприлизин във всяка ямка. За по добра точност, е необходимо да разполагате със субстратен разтвор еквилибриран до температурата на анализ. Смесете реактивите внимателно за 30 сек.

4.2 Измерване на флуоресцентния сигнал:

- За кинетично измерване: Незабавно започнете измерването на флуоресцентния интензитет при $E_x/E_m=490\text{ nm}/520\text{ nm}$ постоянно и записвайте данните на всеки 5 мин в рамките на 30-60 мин.
- За крайно измерване: Инкубирайте на стайна температура на тъмно от 30 мин. до 60 мин. Пазете плаката от светлина. Разбъркайте реактивите и измерете интензитета на флуоресценция при $E_x/E_m=490\text{ nm}/520\text{ nm}$.



SensoLyte[®] 390 ACE2 Activity Assay Kit

Fluorimetric

Catalog #	72086
Kit Size	100 Assays (96-well plate)

- **Optimized Performance:** This kit is optimized to detect ACE2 activity.
- **Enhanced Value:** It provides enough reagents to perform 100 assays in a 96-well format.
- **High Speed:** The entire process can be completed in one hour
- **Assured Reliability:** Detailed protocol and references are provided.

Kit Components, Storage and Handling

Component	Description	Quantity
Component A	Mca/Dnp, ACE2 substrate, Ex/Em=330 nm/390 nm upon cleavage	5 mM, 50 μ L
Component B	Mca fluorescence reference standard, Ex/Em=330 nm /390 nm	1 mM, 10 μ L
Component C	Assay Buffer	20 mL
Component D	Inhibitor of ACE2	100 μ M, 10 μ L
Component E	Stop Solution	10 mL

Other Materials Required (but not provided)

- ACE2 source: The active enzyme (Calbiochem, Cat# 176872), cell lysates, tissue extracts.
- 96-well microplate: Black, flat-bottom, non-binding 96-well plate.
- Fluorescence microplate reader: Capable of detecting emission at 390 nm with excitation at 330 nm.

Storage and Handling

- Store all kit components at -20°C.
- Protect Components A and B from light and moisture.
- Components C and E can be stored at room temperature for convenience.

Introduction

Angiotensin I converting enzyme 2 (ACE2), the newest member of the renin angiotensin system (RAS), is a zinc metallopeptidase that plays a central role in the control of angiotensin peptides.^{1,2} ACE2 has direct effects on cardiac function,³ and is expressed predominantly in vascular endothelial cells of the heart and the kidneys.² It has been reported that ACE2 might protect kidneys in early stages of diabetes.⁴ In addition to its role in the regulation of hypertension, ACE2 is a functional receptor for coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome (SARS).⁵ ACE2 is considered an important therapeutic target for controlling cardiovascular diseases, kidney disease and severe acute respiratory syndrome (SARS) outbreaks.

The SensoLyte[®] 390 ACE2 Activity Assay Kit provides a convenient assay for high throughput screening of ACE2 inhibitors and inducers and for continuous assay of ACE2 activity using Mca/Dnp fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide. In the FRET peptide the fluorescence of Mca is quenched by Dnp. Upon cleavage into two separate fragments by the enzyme, the fluorescence of Mca is recovered, and can be monitored at excitation/emission = 330 nm /390 nm. The assay can detect the activity of subnanogram level of ACE2. Assays are performed in a convenient 96-well microplate format.

Protocol

Note 1: For standard curve, please refer to [Appendix II](#) (optional).

Note 2: Please use Protocol A or B based on your needs.

Protocol A. Screening ACE2 inhibitors using purified enzyme.

1. Prepare working solutions.

Note: Warm all kit components until thawed to room temperature before starting the experiments.

1.1 ACE2 substrate solution: Dilute ACE2 substrate (Component A) 1:100 in assay buffer (Component C). For each experiment prepare fresh substrate solution.

Table 1. ACE2 substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
ACE2 substrate (100X, Component A)	10 μ L
Assay buffer (Component C)	0.99 mL
Total volume	1 mL

1.2 ACE2 diluent: Dilute enzyme to an appropriate concentration in assay buffer (Component C).

1.3 ACE2 inhibitor (DX600): Dilute 100 μ M inhibitor solution (Component D) to 1 μ M in assay buffer (Component C). Add 10 μ l of the 1 μ M inhibitor solution into each of the inhibitor control well of a 96-well plate.

2. Set up the enzymatic reaction.

2.1 Add test compounds and diluted enzyme solution to the microplate wells. For one well of 96-well plate, the suggested volume of enzyme solution is 40 μ L and 10 μ L of test compound.

2.2 Simultaneously establish the following control wells, as deemed necessary:

- Positive control contains ACE2 enzyme without test compound.
- Inhibitor control contains ACE2 enzyme and a known ACE2 inhibitor.

- Vehicle control contains ACE2 enzyme and vehicle used in delivering test compound (e.g. DMSO, concentration not to exceed 1%).
- Test compound control contains assay buffer (Component C) and test compound.
- Substrate control contains assay buffer (Component C).

2.3 Using the assay buffer (Component C), bring the total volume of all controls to 50 μ L.

2.4 Optional: Pre-incubate the plate for 10 min. at assay temperature. Any temperature (the *assay temperature*) from room temperature to 37°C may be used, as long as the subsequent incubations are performed at the same temperature.

3. Run the enzymatic reaction.

3.1 Add 50 μ L of ACE2 substrate solution into each well. For best accuracy, it is advisable to have the ACE2 substrate solution equilibrated to the assay temperature. Mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec.

3.2 Measure fluorescence signal:

- For kinetic reading: Immediately start measuring fluorescence intensity at Ex/Em=330 nm/390 nm continuously and record data every 5 min. for 30 min.
- For end-point reading: Incubate the reaction for 30 min. Keep plate from direct light. Optional: Add 50 μ L of stop solution (Component E) to each well. Mix the reagents and measure fluorescence intensity at Ex/Em=330 nm/390 nm.

3.3 For methods of data analysis: Refer to Appendix I.

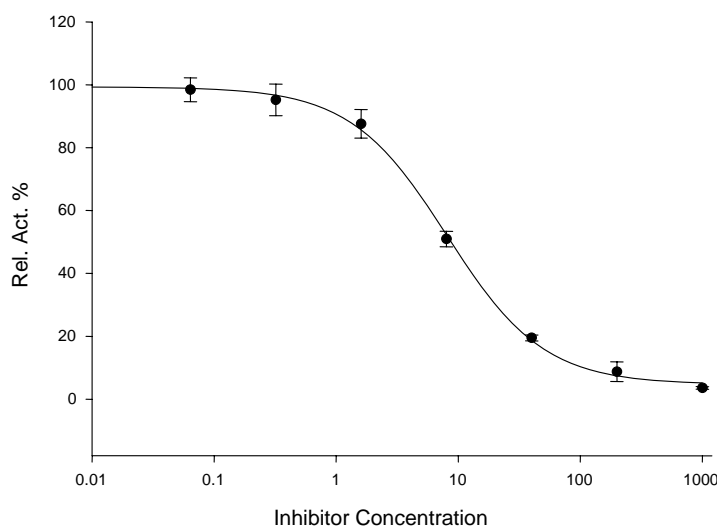


Figure 1. DX600 inhibition of ACE2 activity measured with Sensolyte[®] 390 ACE2 Activity Assay Kit.

Protocol B. Measuring ACE2 activity in biological samples.

1. Prepare ACE2 containing biological samples.

1.1 Prepare cell lysates:

- Wash cells with PBS.
- Add an appropriate amount of assay buffer (Component C) containing 0.1% (v/v) Triton-X 100 to cells or cell pellet. Collect the cell suspension in a microcentrifuge tube.
- Incubate the cell suspension at 4°C for 10 minutes.
- Centrifuge the cell suspension for 10 minutes at 20,000X g, 4°C. Collect the supernatant and store at -70°C until use.

1.2 Prepare tissue samples:

- Homogenize tissue samples in assay buffer (Component C).
- Incubate for 15 min. at 4°C.
- Centrifuge for 10 min. at 20,000xg at 4°C and collect the supernatant. Store at -70°C until use.

Note 1: Triton-X 100 and PBS are not provided.

2. Prepare working solutions.

Note: Warm all kit components until thawed to room temperature before starting the experiments.

2.1 ACE2 substrate solution: Dilute ACE2 substrate (Component A) 1:100 in assay buffer (Component C). For each experiment prepare fresh substrate solution.

Table 1. ACE2 substrate solution for one 96-well plate (100 assays)

Components	Volume
ACE2 substrate (100X, Component A)	50 µL
Assay buffer (Component C)	4.95 mL
Total volume	5 mL

2.2 ACE2 diluent: If purified ACE2 is used as a positive control, then dilute the enzyme to an appropriate concentration in assay buffer (Component C).

3. Set up enzymatic reaction.

3.1 Add 50 µL of ACE2 containing biological sample.

3.2 Simultaneously set up the following control wells, as deemed necessary:

- Positive control contains purified active ACE2.
- Substrate control contains assay buffer.

3.3 Using the assay buffer (Component C), bring the total volume of all controls to 50 µL.

3.3 Optional: Pre-incubate the plate for 10 min. at assay temperature. Any temperature (the *assay temperature*) from room temperature to 37°C may be used, as long as the subsequent incubations are performed at the same temperature.

4. Run the enzymatic reaction.

4.1 Add 50 µL of ACE2 substrate solution into each well. For best accuracy, it is advisable to have the ACE2 substrate solution equilibrated to the assay temperature. Mix the reagents completely by shaking the plate gently for 30 sec.

4.2 Measure fluorescence signal:

- For kinetic reading: Immediately start measuring fluorescence intensity at Ex/Em=330 nm/390 nm continuously and record data every 5 min. for 30 min.
- For end-point reading: Incubate the reaction for 30 min. Keep plate from direct light. Optional: Add 50 µL of stop solution (Component E) to each well. Mix the reagents and measure fluorescence intensity at Ex/Em=330 nm/390 nm.

4.3 For methods of data analysis: Refer to Appendix I.

Appendix I. Data Analysis

- The fluorescence reading from the substrate control well is used as the background fluorescence. This background reading should be subtracted from the readings of the other wells containing substrate. All fluorescence readings are expressed in relative fluorescence units (RFU).
- For kinetics analysis:
 - Plot data as RFU versus time for each sample. To convert RFUs to the concentration of the product of the enzymatic reaction, please refer to [Appendix II](#) for establishing a fluorescence reference standard.
 - Determine the range of initial time points during which the reaction is linear. Typically, the first 10-15% of the reaction will be the optimal range.
 - Obtain the initial reaction velocity (V_o) in RFU/min by determining the slope of the linear portion of the data plot.
 - A variety of data analyses can be done, e.g., determining inhibition %, EC_{50} , IC_{50} , K_m , K_i , etc.
- For endpoint analysis:
 - Plot data as RFU versus concentration of test compounds.
 - A variety of data analyses can be done, e.g., determining inhibition %, EC_{50} , IC_{50} , etc.

Appendix II. Instrument Calibration

- Mca fluorescence reference standard: Dilute 1 mM Mca (Component B) to 10 μ M in assay buffer (Component C). Do 2-fold serial dilutions to get concentrations of 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15 μ M, include an assay buffer blank. Add 50 μ L/well of these serially diluted Mca reference solutions.
- Add 50 μ L/well of the diluted ACE2 substrate solution (refer to Protocol A, step 1.1 for preparation).

Note: The ACE2 substrate solution is added to the Mca reference standard to correct the absorptive quenching by the FRET peptide. If multiple concentrations of substrate are used, this step must be performed for each concentration.
- Plot the Mca fluorescent reference standard curve as RFU (relative fluorescent units) versus concentration as shown in Figure 2.
- The final concentrations of Mca reference standard are 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.075, and 0 μ M. This reference standard is used to calibrate the variation of different instruments and different experiments. It is also an indicator of the amount of final product of the enzymatic reaction.

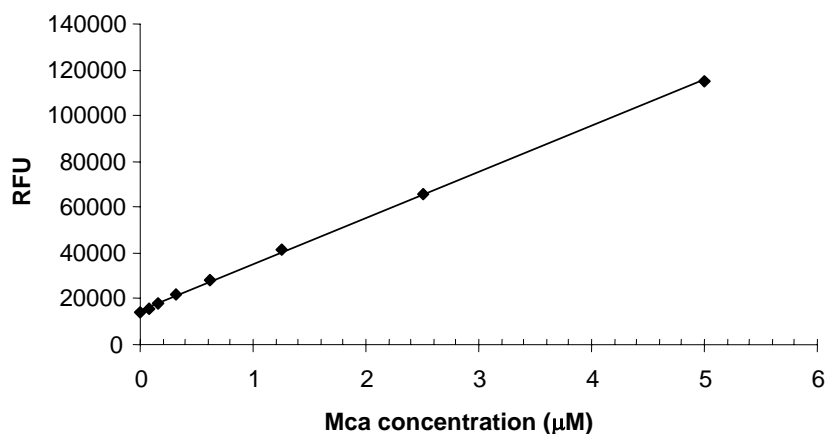


Figure 2. Mca reference standard, Mca was serially diluted in assay buffer containing substrate, and the fluorescence recorded at Ex/Em=330 nm/ 390 nm. (Flexstation 384II, Molecular Devices)

References

1. Katovich, MJ. et al. *Exp. Physiol.* **90**, 299 (2005).
2. Donoghue, M. et al. *Circ. Res.* **87**, E1 (2000).
3. Boehm, M and EG. Nabel, *Engl. J. Med.* **347**, 1795 (2002).
4. Ye, M. et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 3067 (2006).
5. Li, W. et al. *Nature* **426**, 450 (2003).

Лого на AnaSpec

SensoLyte® 390 ACE2 Activity Assay Kit

Fluorimetric

Каталожен №	72086
Обем на кита	100 анализа в 96-ямкова плака
Изпълнение:	Този кит е оптимизиран за доказване на ензимна активност на ACE2
Enhanced Value:	Предоставени са реактиви за 100 теста в 96-ямков формат
Висока скорост	Целия процес може да се извърши за 1 час
Assured Reliability:	Предоставени са подробен протокол и референции

Състав на кита

Компонент	Описание	Количество
Компонент А	Mca/Dnp, ACE2 substrate, Ex/Em=330 nm/390 nm при разграждане	5 mM, 50 µL
Компонент В	Mca, референтен стандарт за флуоресценция, Ex/Em=330/390 nm	1 mM, 10 µL
Компонент С	Буфер за анализ	20 mL
Компонент D	Инхибитор на ACE2	100 µM, 10 µL
Компонент E	Стопиращ разтвор	10 mL

Съхранение и работа

Съхранявайте всички компоненти на кита, с изключение на Компонент С, при -20°C.

Пазете Компоненти А и В от светлина или влага

За удобство, Компоненти С и E може да се съхраняват на стайна температура

Introduction

.....

Протокол

1. Подготовка на биологични проби, съдържащи Неприлизин

1.1. Подготовка на клетъчни екстракти:

- Измийте клетките с PBS
- Добавете подходящо количество от буфера за анализ (Компонент С) съдържащ 0.1% (v/v) Triton-X 100 към клетките или утайката от клетки. Съберете клетъчната суспензия в микроцентрифужна епруветка.
- Инкубирайте клетъчната суспензия на 4°C за 10 мин.
- Центрофугирайте на 20000x g за 10 мин на 4°C. Съберете супернатантата и съхранете на -70°C до употреба

1.2. Подготовка на тъканни екстракти:

- Хомогенизирайте тъканите в буфер за анализ (Компонент С)
- Инкубирайте за 15 мин на 4°C
- Центрофугирайте на 20000x g за 10 мин на 4°C и съберете супернатантата. Съхранявайте на -70°C до употреба

2. Подготовка на работни разтвори:

2.1. ACE2 субстратен разтвор: Разрежете ACE2 субстрата (Компонент А) 100-пъти в буфер за анализ (Компонент С). За всеки експеримент пригответе свеж разтвор

Таблица 1. ACE2 субстратен разтвор за една 96-ямкова плака (100 анализа)

Компоненти	Обем
ACE2 субстрат (100X, Компонент А)	50 μ L
Буфер за анализ (Компонент С)	4.950 mL
Общ обем	5 mL

2.2. ACE2 разредител: Ако се използва пречистен ACE2 като положителна контрола, тогава разтворете ензима до подходяща концентрация в буфер за анализ (Компонент С)

3. Подготовка на ензимната реакция

3.1. Добавете 50 μ L проба, съдържаща ACE2

3.2. Заложете следните контроли:

- Положителна контрола, съдържаща пречистен активен ACE2
- Субстратна контрола, съдържаща дейонизирана вода

3.3. Доведете всички контроли до 50 μ L с буфер за анализ

3.4. Опция: Преинкубирайте плаката за 10 мин. при температура за анализ

4. Стартиране на ензимната реакция

4.1. Добавете 50 μ L от субстратния разтвор на ACE2 във всяка ямка. За по добра точност, е необходимо да разполагате със ACE2 субстратен разтвор еквилибриран до температурата на анализ. Смесете реактивите внимателно за 30 сек.

4.2 Измерване на флуоресцентния сигнал:

- За кинетично измерване: Незабавно започнете измерването на флуоресцентния интензитет при $E_x/E_m=330\text{ nm}/390\text{ nm}$ постоянно и записвайте данните на всеки 5 мин в рамките на 30 мин.
- За крайно измерване: Инкубирайте на стайна температура на тъмно от 30 мин. Пазете плаката от светлина. Разбъркайте реактивите и измерете интензитета на флуоресценция при $E_x/E_m=330\text{ nm}/390\text{ nm}$.



MMP2 (Human) ELISA Kit

Catalog Number KA0391

96 assays

Version: 21

Intended for research use only

www.abnova.com

Table of Contents

Introduction	3
Intended Use	3
Background	3
Principle of the Assay	3
General Information	4
Materials Supplied	4
Storage Instruction	4
Materials Required but Not Supplied	4
Precautions for Use	5
Assay Protocol	6
Reagent Preparation	6
Sample Preparation	6
Assay Procedure	7
Data Analysis.....	9
Calculation of Results	9
Performance Characteristics	9
Resources	10
References	10
Plate Layout	11

Introduction

Intended Use

For quantitative detection of human MMP-2 in cell culture supernates, serum and plasma (heparin).

Background

Type IV collagenase, 72-kD, is officially designated matrix metalloproteinase-2 (MMP2). It is also known as gelatinase, 72-kD. MMP-2 plays an essential role in angiogenesis and arteriogenesis, two processes critical to restoration of tissue perfusion after ischemia. MMP-2 expression is increased in tissue ischemia, but the responsible mechanisms remain unknown.¹ Matrix metalloproteinases (MMPs) catalyze extracellular matrix degradation. Control of their activity is a promising target for therapy of diseases characterized by abnormal connective tissue turnover. MMPs are expressed as latent proenzymes that are activated by proteolytic cleavage that triggers a conformational change in the propeptide (cysteine switch). The structure of proMMP-2 reveals how the propeptide shields the catalytic cleft and that the cysteine switch may operate through cleavage of loops essential for propeptide stability.² The gene is localized to 16q21 using somatic cell hybrids and in situ hybridization.³ The standard product used in this kit is recombinant human MMP-2, consisting of 631 amino acids with the molecular mass of 71 KDa. The detected MMP-2 includes zymogen and active enzyme.

Principle of the Assay

The MMP2 (Human) ELISA Kit was based on standard sandwich enzyme-linked immune-sorbent assay technology. A monoclonal antibody from mouse specific for MMP-2 has been precoated onto 96-well plates. Standards (NSO, A30-C660) and test samples are added to the wells, a biotinylated detection polyclonal antibody from goat specific for MMP-2 is added subsequently and then followed by washing with PBS or TBS buffer. Avidin-Biotin-Peroxidase Complex was added and unbound conjugates were washed away with PBS or TBS buffer. HRP substrate TMB was used to visualize HRP enzymatic reaction. TMB was catalyzed by HRP to produce a blue color product that changed into yellow after adding acidic stop solution. The density of yellow is proportional to the human MMP-2 amount of sample captured in plate.

General Information

Materials Supplied

List of component

Component	Amount
One 96-well plate precoated with anti- human MMP-2 antibody.	96 (8x12) wells
Lyophilized recombinant human MMP-2 standard	10 ng/tube x 2
Biotinylated anti- human MMP-2 antibody, dilution 1:100	130 μ l
Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC), dilution 1:100	130 μ l
Sample diluent buffer	30 ml
Antibody diluent buffer	12 ml
ABC diluent buffer	12 ml
TMB color developing agent	10 ml
TMB stop solution	10 ml

Storage Instruction

Store at 4°C for 6 months, at -20°C for 12 months. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

Materials Required but Not Supplied

- ✓ Microplate reader in standard size.
- ✓ Automated plate washer.
- ✓ Adjustable pipettes and pipette tips. Multichannel pipettes are recommended in the condition of large amount of samples in the detection.
- ✓ Clean tubes and Eppendorf tubes.
- ✓ Washing buffer (neutral PBS or TBS).
- Preparation of 0.01 M TBS:
Add 1.2 g Tris, 8.5 g NaCl; 450 μ l of purified acetic acid or 700 μ l of concentrated hydrochloric acid to 1000 ml H₂O and adjust pH to 7.2-7.6. Finally, adjust the total volume to 1 L.
- Preparation of 0.01 M PBS:
Add 8.5 g sodium chloride, 1.4 g Na₂HPO₄ and 0.2 g NaH₂PO₄ to 1000ml distilled water and adjust pH to 7.2-7.6. Finally, adjust the total volume to 1 L.

Precautions for Use

- ✓ To inspect the validity of experiment operation and the appropriateness of sample dilution proportion, pilot experiment using standards and a small number of samples is recommended.
- ✓ The TMB Color Developing agent is colorless and transparent before using, contact us freely if it is not the case.
- ✓ Before using the Kit, spin tubes and bring down all components to the bottom of tubes.
- ✓ Duplicate well assay is recommended for both standard and sample testing.
- ✓ Don't let 96-well plate dry, for dry plate will inactivate active components on plate.
- ✓ Don't reuse tips and tubes to avoid cross contamination.
- ✓ To avoid to use the reagents from different batches together.
- ✓ In order to avoid marginal effect of plate incubation due to temperature difference (reaction may be stronger in the marginal wells), it is suggested that the diluted ABC and TMB solution will be pre-warmed in 37°C for 30 min before using.

Assay Protocol

Reagent Preparation

- ✓ Reconstitution of the human MMP-2 standard: MMP-2 standard solution should be prepared no more than 2 hours prior to the experiment. Two tubes of MMP-2 standard (10 ng per tube) are included in each kit. Use one tube for each experiment.
 - 10,000 pg/ml of human MMP-2 standard solution: Add 1 ml sample diluent buffer into one tube, keep the tube at room temperature for 10 min and mix thoroughly.
 - 5000 pg/ml→156 pg/ml of human MMP-2 standard solutions: Label 6 Eppendorf tubes with 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312 pg/ml, 156 pg/ml, respectively. Aliquot 0.3 ml of the sample diluent buffer into each tube. Add 0.3 ml of the above 10,000 pg/ml MMP-2 standard solution into 1st tube and mix. Transfer 0.3 ml from 1st tube to 2nd tube and mix. Transfer 0.3 ml from 2nd tube to 3rd tube and mix, and so on.

Note: The standard solutions are best used within 2 hours. The 10 ng/ml standard solution may be stored at 4°C for up to 12 hours, or at -20°C for up to 48 hours. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

- ✓ Preparation of biotinylated anti-human MMP-2 antibody working solution: The solution should be prepared no more than 2 hours prior to the experiment.
 - The total volume should be: 0.1 ml/well x (the number of wells). (Allowing 0.1-0.2 ml more than total volume)
 - Biotinylated anti-human MMP-2 antibody should be diluted in 1:100 with the antibody diluent buffer and mixed thoroughly. (i.e. Add 1 µl Biotinylated anti-human MMP-2 antibody to 99 µl antibody diluent buffer.)
- ✓ Preparation of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) working solution: The solution should be prepared no more than 1 hour prior to the experiment.
 - The total volume should be: 0.1 ml/well x (the number of wells). (Allowing 0.1-0.2 ml more than total volume)
 - Avidin- Biotin-Peroxidase Complex (ABC) should be diluted in 1:100 with the ABC dilution buffer and mixed thoroughly. (i.e. Add 1 µl ABC to 99 µl ABC diluent buffer.)

Sample Preparation

- ✓ Sample Preparation and Storage

Store samples to be assayed within 24 hours at 2-8°C. For long-term storage, aliquot and freeze samples at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- Cell culture supernate: Remove particulates by centrifugation, assay immediately or aliquot and store samples at -20°C.

- Serum: Allow the serum to clot in a serum separator tube (about 4 hours) at room temperature. Centrifuge at approximately 1000 X g for 15 min. Analyze the serum immediately or aliquot and store samples at -20°C.
- Plasma: Collect plasma using heparin or EDTA as an anticoagulant. Centrifuge for 15 min at 1500 x g within 30 min of collection. Analyze immediately or aliquot and store samples at -20°C.

✓ **Sample Dilution Guideline**

The user needs to estimate the concentration of the target protein in the sample and select a proper dilution factor so that the diluted target protein concentration falls near the middle of the linear regime in the standard curve. Dilute the sample using the provided diluent buffer. The following is a guideline for sample dilution. Several trials may be necessary in practice. The sample must be well mixed with the diluents buffer.

- High target protein concentration (100-1000 ng/ml). The working dilution is 1:100. i.e. Add 1 µl sample into 99 µl sample diluent buffer.
- Medium target protein concentration (10-100 ng/ml). The working dilution is 1:10. i.e. Add 10 µl sample into 90 µl sample diluent buffer.
- Low target protein concentration (156-10,000 pg/ml). The working dilution is 1:2. i.e. Add 50 µl sample to 50 µl sample diluent buffer.
- Very Low target protein concentration (≤ 156 pg/ml). No dilution necessary, or the working dilution is 1:2.

Assay Procedure

The ABC working solution and TMB color developing agent must be kept warm at 37°C for 30 min before use. When diluting samples and reagents, they must be mixed completely and evenly. Standard MMP-2 detection curve should be prepared for each experiment. The user will decide sample dilution fold by crude estimation of MMP-2 amount in samples.

1. Aliquot 0.1 ml per well of the 10,000 pg/ml, 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312 pg/ml, 156 pg/ml human MMP-2 standard solutions into the precoated 96-well plate. Add 0.1 ml of the sample diluent buffer into the control well (Zero well). Add 0.1 ml of each properly diluted sample of human cell culture supernatants, serum or plasma (heparin) to each empty well. See "Sample Dilution Guideline" above for details. It is recommended that each human MMP-2 standard solution and each sample is measured in duplicate.
2. Seal the plate with the cover and incubate at 37°C for 90 min.
3. Remove the cover, discard plate content, and blot the plate onto paper towels or other absorbent material. Do NOT let the wells completely dry at any time.
4. Add 0.1 ml of biotinylated anti-human MMP-2 antibody working solution into each well and incubate the plate at 37°C for 60 min.
5. Wash the plate 3 times with 0.01 M TBS or 0.01 M PBS, and each time let washing buffer stay in the wells for 1 min. Discard the washing buffer and blot the plate onto paper towels or other absorbent material.

(Plate Washing Method: Discard the solution in the plate without touching the side walls. Blot the plate onto paper towels or other absorbent material. Soak each well with at least 0.3 ml PBS or TBS buffer for 1~2 minutes. Repeat this process two additional times for a total of THREE washes. *Note: For automated washing, aspirate all wells and wash THREE times with PBS or TBS buffer, overfilling wells with PBS or TBS buffer. Blot the plate onto paper towels or other absorbent material.*)

6. Add 0.1 ml of prepared ABC working solution into each well and incubate the plate at 37°C for 30 min.
7. Wash plate 5 times with 0.01 M TBS or 0.01 M PBS, and each time let washing buffer stay in the wells for 1-2 min. Discard the washing buffer and blot the plate onto paper towels or other absorbent material. (See Step 5 for plate washing method.)
8. Add 90 µl of prepared TMB color developing agent into each well and incubate plate at 37°C in dark for 20-25 min (*Note: It is for reference only, the optimal incubation time should be determined by end user. And the shades of blue can be seen in the wells with the four most concentrated human MMP-2 standard solutions; the other wells show no obvious color.*)
9. Add 0.1 ml of prepared TMB stop solution into each well. The color changes into yellow immediately.
10. Read the O.D. absorbance at 450 nm in a microplate reader within 30 min after adding the stop solution.

✓ Summary

1. Add samples and standards and incubate the plate at 37°C for 90 min. Do not wash.
2. Add biotinylated antibodies and incubate the plate at 37°C for 60 min. Wash plate 3 times with 0.01 M TBS.
3. Add ABC working solution and incubate the plate at 37°C for 30 min. Wash plate 5 times with 0.01 M TBS.
4. Add TMB color developing agent and incubate the plate at 37°C in dark for 20-25 min.
5. Add TMB stop solution and read.

Data Analysis

Calculation of Results

For calculation, (the relative O.D.₄₅₀) = (the O.D.₄₅₀ of each well) – (the O.D.₄₅₀ of Zero well). The standard curve can be plotted as the relative O.D.₄₅₀ of each standard solution (Y) vs. the respective concentration of the standard solution (X). The human MMP-2 concentration of the samples can be interpolated from the standard curve.

Note: if the samples measured were diluted, multiply the dilution factor to the concentrations from interpolation to obtain the concentration before dilution.

✓ Typical result

Typical Data Obtained from MMP2 (Human) ELISA Kit
(TMB reaction incubate at 37°C for 20 min)

Concentration (pg/ml)	0.0	156	312	625	1250	2500	5000	10,000
O.D.	0.132	0.155	0.202	0.280	0.446	0.835	1.586	2.491

Performance Characteristics

✓ Range

156 pg/ml-10,000 pg/ml

✓ Sensitivity

<10 pg/ml

✓ Specificity

Natural and recombinant human total MMP-2

✓ Cross-reactivity

No detectable cross-reactivity with other relevant proteins.

Resources

References

1. Lee, J. G.; Dahi, S.; Mahimkar, R.; Tulloch, N. L.; Alfonso-Jaume, M. A.; Lovett, D. H.; Sarkar, R. Intronic regulation of matrix metalloproteinase-2 revealed by in vivo transcriptional analysis in ischemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 16345-16350, 2005.
2. Morgunova, E.; Tuuttila, A.; Bergmann, U.; Isupov, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Tryggvason, K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284: 1667-1670, 1999.
3. Huhtala, P.; Eddy, R. L.; Fan, Y. S.; Byers, M. G.; Shows, T. B.; Tryggvason, K. Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16. *Genomics* 6: 554-559, 1990.

Plate Layout

12								
11								
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
	A	B	C	D	E	F	G	H



Човешки MMP-2 ELISA кит за 96 теста

Компоненти на кита:

Component	Amount
One 96-well plate precoated with anti- human MMP-2 antibody.	96 (8x12) wells
Lyophilized recombinant human MMP-2 standard	10 ng/tube x 2
Biotinylated anti- human MMP-2 antibody, dilution 1:100	130 μ l
Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC), dilution 1:100	130 μ l
Sample diluent buffer	30 ml
Antibody diluent buffer	12 ml
ABC diluent buffer	12 ml
TMB color developing agent	10 ml
TMB stop solution	10 ml

Инструкции за съхранение:

Китът се съхранява при 4 ° C в продължение на 6 месеца при -20 ° C в продължение на 12 месеца. Избягвайте многократни цикли на замразяване-размразяване.

Протокол за работа:

1. Разтваряне на MMP-2 стандарт човека: MMP-2 стандарт разтвор трябва да се получи не повече от 2 часа преди експеримент. Two тръби на MMP-2 стандарт (10 нг на тръба) са включени във всеки комплект. Използвайте една тръба за всеки експеримент

10000 pg / мл на MMP-2 стандарт, разтвор на човешки: Добавете 1 мл проба разредител буфер в една тръба, дръжте тръбата при стайна температура за 10 минути и се разбърква старателно.

5000 pg / мл → 156 пг / мл на човешките MMP-2 стандартни решения: етикет 6 Епендорф тръби с 5000 pg / мл, 2500 PG / мл, 1250 PG / мл, 625 PG / мл, 312 PG / мл, 156 стр / мл, съответно. Аликвотна 0,3 мл проба буфер за разреждане на всяка тръба на. Добави 0.3 мл от горния 10,000 PG / мл MMP-2 стандарт разтвор в първата тръба и се разбърква. Прехвърлете 0,3 мл от първия тръба към втора тръба и се смесва. Прехвърлете 0,3 мл от втора тръба към трето тръба и се смесват, и така нататък.

Забележка: Стандартните разтвори са използвани най-добрите в рамките на 2 часа. От 10 нг / мл стандартен разтвор може да се съхранява при 4 ° C в продължение на до 12 часа,

или при -20°C в продължение на до 48 часа. Да се избягва многократно замразяване-размразяване.

2. Получаване на биотинилиран работен разтвор анти-човешки MMP-2 антитяло: Разтворът трябва да се получат не повече от 2 часа преди началото на експеримента.

Общият обем трябва да бъде: 0.1 мл / и x (брой на ямки). (Позволяваща 0,1-0,2 мл повече от общия обем)

Биотинилиран анти-човешки MMP-2 антитяло трябва да се разрежда в 1: 100 с разредител антитяло буфер и се смесват добре.

3. Получаване на авидин-биотин-пероксидазен комплекс (ABC) работен разтвор: Разтворът трябва да се получат не повече от 1 час преди експеримента.

Общият обем трябва да бъде: 0.1 мл / и x (брой на ямки). (Позволяваща 0,1-0,2 мл повече от общия обем)

Avidin- биотин-пероксидазен комплекс (ABC) трябва да се разрежда в 1: 100 с буфер за разреждане ABC и се смесват добре.

Подготовка и съхранение на пробите:

Записани проби да бъдат изследвани в рамките на 24 часа при температура $2-8^{\circ}\text{C}$. За дългосрочно съхранение, аликвоните и замразяване на проби при -20°C . Да се избягва многократно замразяване-размразяване.

Клетъчна култура супернат: Премахване на частици чрез центрофугиране, анализ незабавно, или аликвоните и съхраняват проби при -20°C .

Серум: Оставете серума съсирек в серум сепаратор тръба (около 4 часа) при стайна температура. Центрофугирайте при приблизително 1000 x g за 15 минути. Анализирайте серума незабавно или аликвоните и съхраняват проби при -20°C .

Плазма: Събирайте плазма с помощта на хепарин или EDTA като антикоагулант. Центрофугирайте в продължение на 15 минути при 1500 x g в рамките на 30 мин на събиране. Анализирайте веднага или аликвоните и съхраняват проби при -20°C .

Потребителят трябва да се изчисли концентрацията на целевия протеин в пробата и изберете подходящ коефициент на разреждане, така че концентрацията разрежда целеви протеин попада в близост до центъра на линеен режим в стандартната крива. Разрежете пробата с помощта на предоставения разредител буфер. Следното е ориентир за разреждане на пробата. Няколко проучвания могат да бъдат необходими в практиката. Пробата трябва да бъде добре смесен с буфера разредители.

Тест протокол:

Работният разтвор на ABC и TMB цвят разработване агент трябва да се държат на топло при 37°C , в продължение на 30 минути преди употреба. При разреждане на проби и реактиви, те трябва да се смесва напълно и равномерно. Стандартна MMP-2 крива откриване трябва да бъдат подготвени за всеки експеримент. Потребителят ще реши кратко разреждане на пробата от суров оценка на MMP-2 сума в пробите.

1. Аликвоти 0.1 ml на ямка на 10,000pg / мл, 5000pg / мл, 2500pg / мл, 1250pg / мл, 625pg / мл, 312pg / мл, 156pg / мл човешки MMP-2standard разтвори в предварително покрити 96-ямкова плоча. Добавете 0,1 ml разредител буфера на пробата в контрола добре (нула добре).
Добавяне на 0.1 ml от всяка проба на правилно разрежда humancell културални супернатанти, серум от plasma (хепарин) за всяка празна добре. Вижте "Насоки за разреждане на пробата" по-горе за details. It е recommended that всяко човешко MMP-2standard решение и всяка проба се измерва в два екземпляра.
2. Запечатайте плоча с капак и се инкубира при 37 ° C в продължение на 90 минути.
3. Махнете капака, съдържанието изхвърляне плоча и излици плочата върху хартиени кърпи или друг абсорбиращ материал. Не позволявайте на кладенците напълно суха, по всяко време.
4. Добавете 0.1 ml на биотинилирано анти-човешко работен разтвор MMP-2antibody във всяка ямка и се инкубира плоча при 37 ° C в продължение на 60 минути.
5. Измийте табела 3times с 0.01M TBS или 0,01 M PBS, и всеки път, когато ви позволяват измиване буфер пребиваване в ямките за 1 min. Discard буфера за промиване и поийте плоча върху хартиени кърпи или друг абсорбиращ материал.

(Метод за миене на плаката: Изхвърлете разтвора в чинията, без да докосва страничните стени. Подсушава плочата върху хартиени кърпи или други абсорбиращи материали. Потопете всяко гнездо с най-малко 0,3 ml PBS или TBS буфер за 1 ~ 2 минути. Повторете този процес два... . допълнителни пъти за общо THREEwashes. Забележка: за автоматизирано измиване, аспирирайте всички кладенци и мият THREEdimes с PBS или TBS буфер, препълване на ямките с PBS или TBS буфер. BLOT плочата върху хартиени кърпи или други абсорбиращи материали)..
6. Добави 0.1ml на готов работен разтвор ABC във всяка ямка и се инкубира на плоча при 37 ° C в продължение на 30 минути.
7. Плочката се промива 5 timeswith 0.01M TBS или 0.01 M PBS, и всеки път да промивен буфер престой в ямките в продължение на 1-2 min. Discard промивен буфер и блот плоча върху хартиени кърпи или други абсорбиращи материали. (Виж Стъпка 5 за плоча метод измиване.)
8. Добавете 90 мкл подготвени TMB цвят разработване агент във всяко гнездо и се инкубира плоча при 37 ° C in darkfor 20-25min (Забележка: . Тя е само за справка, оптималното време за инкубация трябва да се определя от крайния потребител и в нюанси на синьото може да се види в ямките с четирите най-концентрирани човешки MMP-2standard решения; другите ямки не показват очевидно цвят).
9. Добавяне на 0.1 ml готов стоп TMB разтвор във всяка ямка. Цветът се променя в жълто веднага.
10. Прочетете O.D. абсорбция при 450 nm в четец за микроплаки рамките на 30 минути след добавяне на разтвор за спиране.

Обобщение:

1. Добави проби и стандарти и инкубирайте плоча при 37 ° C в продължение на 90 минути. Не мийте.
2. Добави биотинилирани антитела и инкубирайте плоча при 37 ° C в продължение на 60 минути. Плочката се промива 3 пъти с 0.01 M TBS.
3. Добави работен разтвор ABC и инкубирайте плоча при 37 ° C в продължение на 30 минути. Плочката се промива 5 пъти с 0.01 M TBS.
4. Добавете TMB цвят разработване агент и инкубирайте плоча при 37 ° C на тъмно за 20-25min.
5. Добавете стоп разтвор TMB и отчетете резултата.

Типични резултати от използването на MMP -2 ELISA кит

Concentration (pg/ml)	0.0	156	312	625	1250	2500	5000	10,000
O.D.	0.132	0.155	0.202	0.280	0.446	0.835	1.586	2.491

PRODUCT INFORMATION & MANUAL

Human MMP-9 Platinum ELISA

BMS2016/2 and BMS2016/2TEN

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for
quantitative detection of human MMP-9.

For research use only.

Not for diagnostic or therapeutic procedures.



*Human MMP-9
Platinum ELISA*

North America

Technical Support:

Research Products:
888.810.6168
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Clinical Products:
877.726.8559
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Customer Service:

888.999.1371
858.642.2058
info@eBioscience.com

Fax:

858.642.2046

Europe/International*

Technical Support:

+43 1 796 40 40-120
tech@eBioscience.com

Customer Service:

+43 1 796 40 40-304
europe@eBioscience.com

Fax:

+43 1 796 40 40-400



Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
1030 Vienna, Austria
www.eBioscience.com

* Customers outside North America and Europe may contact their eBioscience distributor listed on our website at www.eBioscience.com/distributors.

TABLE OF CONTENTS

1.	Intended Use	3
2.	Summary	3
3.	Principles of the Test	4
4.	Reagents Provided	6
5.	Storage Instructions – ELISA Kit	8
6.	Specimen Collection and Storage Instructions	8
7.	Materials Required But Not Provided	9
8.	Precautions for Use	10
9.	Preparation of Reagents	12
10.	Test Protocol	17
11.	Calculation of Results	22
12.	Limitations	25
13.	Performance Characteristics	26
14.	Ordering Information	31
15.	Reagent Preparation Summary	31
16.	Test Protocol Summary	33

1. Intended Use

The human MMP-9 ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of human MMP-9. **The human MMP-9 ELISA is for research use only. Not for diagnostic or therapeutic procedures.**

2. Summary

Matrix metalloproteinases (MMPs) form a family of enzymes with major actions in the remodelling of extracellular matrix (ECM) components. MMP-9, also called Gelatinase B, is the most complex family member in terms of domain structure and regulation of its activity. MMP-9 activity is under strict control at various levels: transcription of the gene by cytokines and cellular interactions; activation of the pro-enzyme by a cascade of enzymes comprising serine proteases and other MMPs; and regulation by specific tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) or unspecific inhibitors. Further glycosylation has a limited effect on the net activity of Gelatinase B and chemotactic factors are another level of control of activity.

The main function of MMPs is degradation of the extracellular physiologic function including wound healing, bone resorption and mammary involution. MMPs also contribute to pathological conditions such as rheumatoid arthritis, coronary artery disease and cancer. They are thought to promote the growth of these tumor cells once they have metastasized. MMP-9 plays an important role in tumor invasion, angiogenesis and metastasis.

Increased levels of MMP-9 have been demonstrated in colorectal cancer, in acute leukemia, breast cancer, human melanoma and bladder cancer. MMP-9 potentiates pulmonary metastasis formation and glioma invasion.

Apart from its function in tumor formation and spread, MMP-9 with its destructive effects is in close association with lung diseases and asthma.

Leukocyte recruitment to the central nervous system MMP-9 means an involvement in the pathogenesis of multiple sclerosis. MMP-9 has a crucial role in reproductive endocrinology and shows a changed expression pattern after myocardial infarction.

For literature update refer to **www.eBioscience.com**

3. Principles of the Test

An anti-human MMP-9 coating antibody is adsorbed onto microwells.

Human MMP-9 present in the sample or standard binds to antibodies adsorbed to the microwells. A biotin-conjugated anti-human MMP-9 antibody is added and binds to human MMP-9 captured by the first antibody.

Following incubation unbound biotin-conjugated anti-human MMP-9 antibody is removed during a wash step. Streptavidin-HRP is added and binds to the biotin-conjugated anti-human MMP-9 antibody.

Following incubation unbound Streptavidin-HRP is removed during a wash step, and substrate solution reactive with HRP is added to the wells.

Figure 1

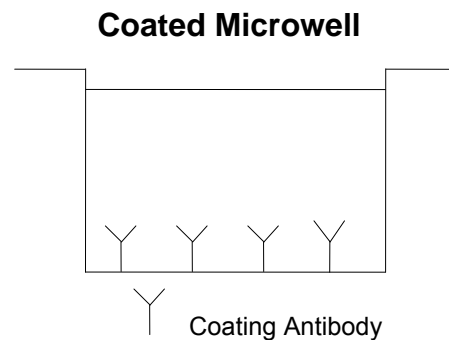


Figure 2

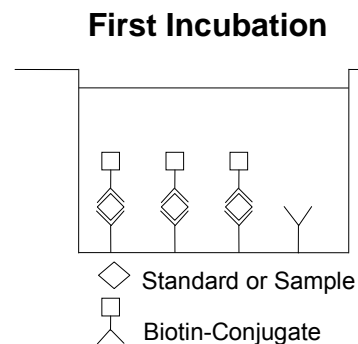


Figure 3

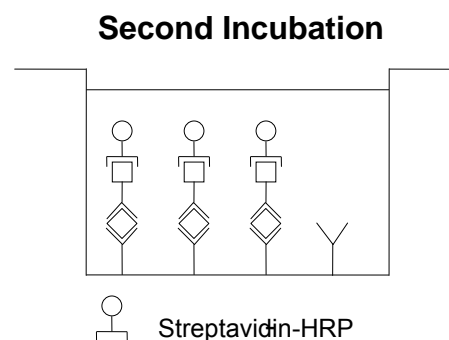
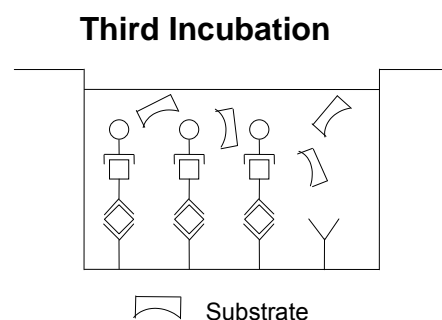
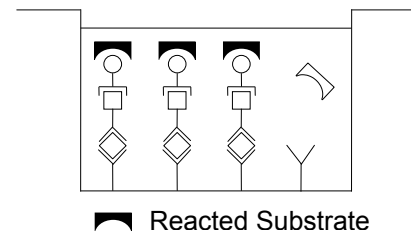


Figure 4



A coloured product is formed in proportion to the amount of human MMP-9 present in the sample or standard. The reaction is terminated by addition of acid and absorbance is measured at 450 nm. A standard curve is prepared from 7 human MMP-9 standard dilutions and human MMP-9 sample concentration determined.

Figure 5



4. Reagents Provided

4.1 Reagents for human MMP-9 ELISA BMS2016/2 (96 tests)

- 1 aluminium pouch with a **Microwell Plate coated** with monoclonal antibody to human MMP-9
- 1 vial (100 µl) **Biotin-Conjugate** anti-human MMP-9 polyclonal antibody
- 1 vial (150 µl) **Streptavidin-HRP**
- 2 vials human MMP-9 **Standard** lyophilized, 30 ng/ml upon reconstitution
- 1 vial (5 ml) **Assay Buffer Concentrate 20x**
(PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)
- 1 bottle (50 ml) **Wash Buffer Concentrate 20x**
(PBS with 1% Tween 20)
- 1 vial (15 ml) **Substrate Solution** (tetramethyl-benzidine)
- 1 vial (15 ml) **Stop Solution** (1M Phosphoric acid)
- 1 vial (0.4 ml) **Blue-Dye**
- 1 vial (0.4 ml) **Green-Dye**
- 1 vial (0.4 ml) **Red-Dye**
- 4 **Adhesive Films**

4.2 Reagents for human MMP-9 ELISA BMS2016/2TEN (10x96 tests)

- 10 aluminium pouches with a **Microwell Plate coated** with monoclonal antibody to human MMP-9
- 10 vials (100 µl) **Biotin-Conjugate** anti-human MMP-9 polyclonal antibody
- 10 vials (150 µl) **Streptavidin-HRP**
- 10 vials human MMP-9 **Standard** lyophilized, 30 ng/ml upon reconstitution
- 5 vials (5 ml) **Assay Buffer Concentrate 20x**
(PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)
- 5 bottles (50 ml) **Wash Buffer Concentrate 20x**
- 10 vials (15 ml) **Substrate Solution** (tetramethyl-benzidine)
- 10 vials (15 ml) **Stop Solution** (1M Phosphoric acid)
- 6 vials (0.4 ml) **Blue-Dye**
- 6 vials (0.4 ml) **Green-Dye**
- 6 vials (0.4 ml) **Red-Dye**
- 20 **Adhesive Films**

5. Storage Instructions – ELISA Kit

Store kit reagents between 2° and 8°C. Immediately after use remaining reagents should be returned to cold storage (2° to 8°C). Expiry of the kit and reagents is stated on labels.

Expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, this reagent is not contaminated by the first handling.

6. Specimen Collection and Storage Instructions

Cell culture supernatant, serum* and plasma (citrate, heparin) were tested with this assay. Other biological samples might be suitable for use in the assay. Remove serum or plasma from the clot or cells as soon as possible after clotting and separation.

Pay attention to a possible “**Hook Effect**” due to high sample concentrations (see chapter 11).

Samples containing a visible precipitate must be clarified prior to use in the assay. Do not use grossly hemolyzed or lipemic specimens.

Samples should be aliquoted and must be stored frozen at -20°C to avoid loss of bioactive human MMP-9. If samples are to be run within 24 hours, they may be stored at 2° to 8°C (for sample stability refer to 13.5).

Avoid repeated freeze-thaw cycles. Prior to assay, the frozen sample should be brought to room temperature slowly and mixed gently.

* Pay attention to a possibly elevated serum level of human MMP-9 due to MMP-9 release by platelets during platelet activation (sampling process).

7. Materials Required But Not Provided

- 5 ml and 10 ml graduated pipettes
- 5 μ l to 1000 μ l adjustable single channel micropipettes with disposable tips
- 50 μ l to 300 μ l adjustable multichannel micropipette with disposable tips
- Multichannel micropipette reservoir
- Beakers, flasks, cylinders necessary for preparation of reagents
- Device for delivery of wash solution (multichannel wash bottle or automatic wash system)
- Microwell strip reader capable of reading at 450 nm (620 nm as optional reference wave length)
- Glass-distilled or deionized water
- Statistical calculator with program to perform regression analysis

8. Precautions for Use

- All reagents should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water. See material safety data sheet(s) and/or safety statement(s) for specific advice.
- Reagents are intended for research use only and are not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or other sources.
- Do not use kit reagents beyond expiration date on label.
- Do not expose kit reagents to strong light during storage or incubation.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat or smoke in areas where kit reagents or samples are handled.
- Avoid contact of skin or mucous membranes with kit reagents or specimens.
- Rubber or disposable latex gloves should be worn while handling kit reagents or specimens.
- Avoid contact of substrate solution with oxidizing agents and metal.
- Avoid splashing or generation of aerosols.
- In order to avoid microbial contamination or cross-contamination of reagents or specimens which may invalidate the test use disposable pipette tips and/or pipettes.
- Use clean, dedicated reagent trays for dispensing the conjugate and substrate reagent.

- Exposure to acid inactivates the conjugate.
- Glass-distilled water or deionized water must be used for reagent preparation.
- Substrate solution must be at room temperature prior to use.
- Decontaminate and dispose specimens and all potentially contaminated materials as they could contain infectious agents. The preferred method of decontamination is autoclaving for a minimum of 1 hour at 121.5°C.
- Liquid wastes not containing acid and neutralized waste may be mixed with sodium hypochlorite in volumes such that the final mixture contains 1.0% sodium hypochlorite. Allow 30 minutes for effective decontamination. Liquid waste containing acid must be neutralized prior to the addition of sodium hypochlorite.

9. Preparation of Reagents

Buffer Concentrates should be brought to room temperature and should be diluted before starting the test procedure.

If crystals have formed in the **Buffer Concentrates**, warm them gently until they have completely dissolved.

9.1. Wash Buffer (1x)

Pour entire contents (50 ml) of the **Wash Buffer Concentrate** (20x) into a clean 1000 ml graduated cylinder. Bring to final volume of 1000 ml with glass-distilled or deionized water. Mix gently to avoid foaming.

Transfer to a clean wash bottle and store at 2° to 25°C. Please note that Wash Buffer (1x) is stable for 30 days.

Wash Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x) (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

9.2. Assay Buffer (1x)

Pour the entire contents (5 ml) of the **Assay Buffer Concentrate** (20x) into a clean 100 ml graduated cylinder. Bring to final volume of 100 ml with distilled water. Mix gently to avoid foaming.

Store at 2° to 8°C. Please note that the Assay Buffer (1x) is stable for 30 days.

Assay Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (20x) (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

9.3. Biotin-Conjugate

Please note that the Biotin-Conjugate should be used within 30 minutes after dilution.

Make a 1:100 dilution of the concentrated **Biotin-Conjugate** solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

9.4. Streptavidin-HRP

Please note that the Streptavidin-HRP should be used within 30 minutes after dilution.

Make a 1:200 dilution of the concentrated **Streptavidin-HRP** solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Streptavidin-HRP (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

9.5. Human MMP-9 Standard

Reconstitute **human MMP-9 Standard** by addition of distilled water. Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial. Swirl or mix gently to insure complete and homogeneous solubilization (concentration of reconstituted standard = 30 ng/ml). Allow the standard to reconstitute for 10-30 minutes. Mix well prior to making dilutions.

After usage remaining standard cannot be stored and has to be discarded.

Standard dilutions can be prepared directly on the microwell plate (see 10.d) or alternatively in tubes (see 9.4.1).

9.4.1. External Standard Dilution

Label 7 tubes, one for each standard point.

S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7

Then prepare 1:2 serial dilutions for the standard curve as follows:
Pipette 225 µl of Assay Buffer (1x) into each tube.

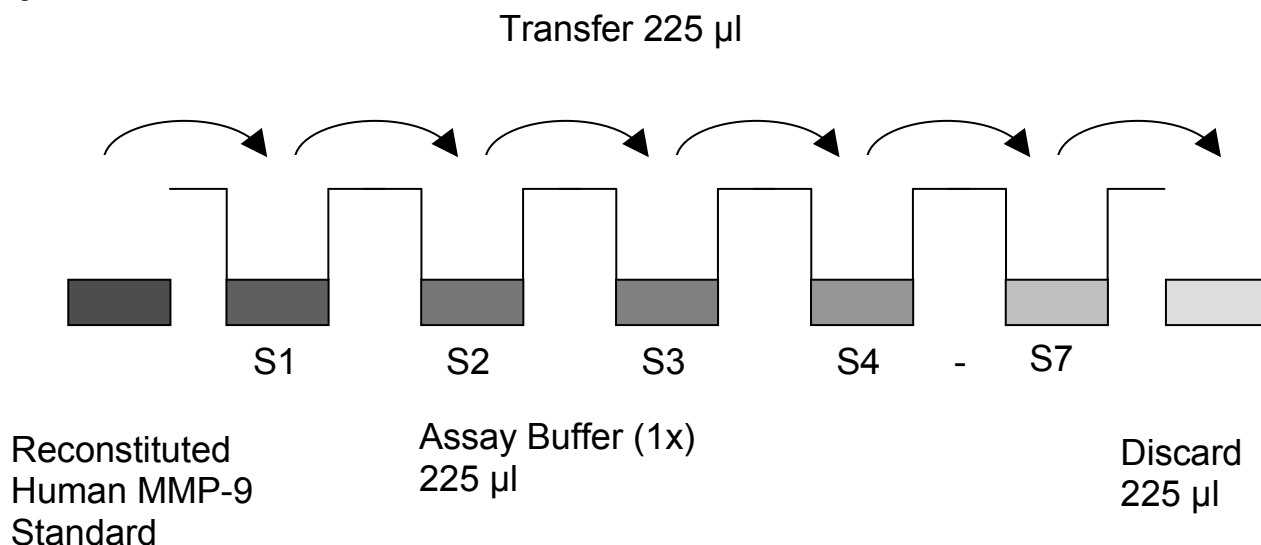
Pipette 225 µl of reconstituted standard (concentration of standard = 30 ng/ml) into the first tube, labelled S1, and mix (concentration of standard 1 = 15 ng/ml).

Pipette 225 µl of this dilution into the second tube, labelled S2, and mix thoroughly before the next transfer.

Repeat serial dilutions 5 more times thus creating the points of the standard curve (see Figure 6).

Assay Buffer (1x) serves as blank.

Figure 6



9.6. Addition of Colour-giving Reagents: Blue-Dye, Green-Dye, Red-Dye

In order to help our customers to avoid any mistakes in pipetting the Platinum ELISAs, eBioscience offers a tool that helps to monitor the addition of even very small volumes of a solution to the reaction well by giving distinctive colours to each step of the ELISA procedure.

This procedure is optional, does not in any way interfere with the test results, and is designed to help the customer with the performance of the test, but can also be omitted, just following the instruction booklet.

Alternatively, the dye solutions from the stocks provided (**Blue-Dye**, **Green-Dye**, **Red-Dye**) can be added to the reagents according to the following guidelines:

- 1. Diluent:** Before standard and sample dilution add the **Blue-Dye** at a dilution of 1:250 (see table below) to the appropriate diluent (1x) according to the test protocol. After addition of **Blue-Dye**, proceed according to the instruction booklet.

5 ml Assay Buffer (1x)	20 μ l Blue-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	48 μ l Blue-Dye
50 ml Assay Buffer (1x)	200 μ l Blue-Dye

- 2. Biotin-Conjugate:** Before dilution of the concentrated Biotin-Conjugate, add the **Green-Dye** at a dilution of 1:100 (see table below) to the Assay Buffer (1x) used for the final conjugate dilution. Proceed after addition of **Green-Dye** according to the instruction booklet: Preparation of Biotin-Conjugate.

3 ml Assay Buffer (1x)	30 μ l Green-Dye
6 ml Assay Buffer (1x)	60 μ l Green-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	120 μ l Green-Dye

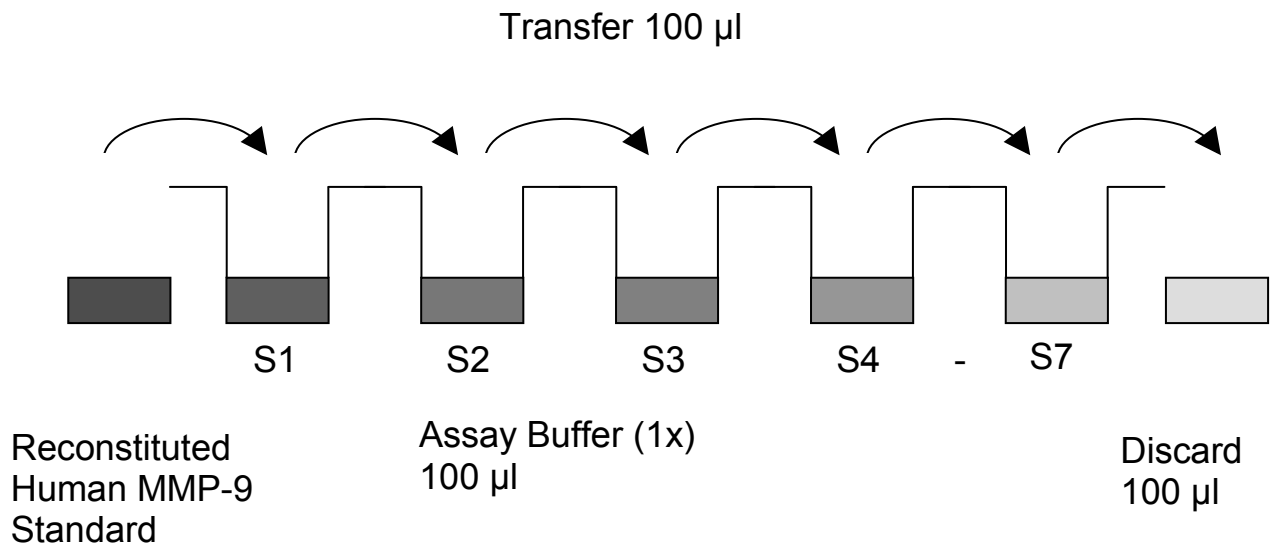
- 3. Streptavidin-HRP:** Before dilution of the concentrated Streptavidin-HRP, add the **Red-Dye** at a dilution of 1:250 (see table below) to the Assay Buffer (1x) used for the final Streptavidin-HRP dilution. Proceed after addition of **Red-Dye** according to the instruction booklet: Preparation of Streptavidin-HRP.

6 ml Assay Buffer (1x)	24 μ l Red-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	48 μ l Red-Dye

10. Test Protocol

- a. Samples from apparently healthy donors will not need external predilution (see 13.7 Expected Values). For pathological samples with expected higher values of MMP-9 predilute your samples 1:10 to 1:25 with Assay Buffer (1x) before starting with the test procedure according to one of the following schemes:
1:10 dilution: 25 μ l sample + 225 μ l Assay Buffer (1x)
1:25 dilution: 10 μ l sample + 240 μ l Assay Buffer (1x)
- b. Determine the number of microwell strips required to test the desired number of samples plus appropriate number of wells needed for running blanks and standards. Each sample, standard and blank should be assayed in duplicate. Remove extra microwell strips from holder and store in foil bag with the desiccant provided at 2°-8°C sealed tightly.
- c. Wash the microwell strips twice with approximately 400 μ l **Wash Buffer** per well with thorough aspiration of microwell contents between washes. Allow the Wash Buffer to sit in the wells for about **10 – 15 seconds** before aspiration. Take care not to scratch the surface of the microwells.
After the last wash step, empty wells and tap microwell strips on absorbent pad or paper towel to remove excess Wash Buffer. Use the microwell strips immediately after washing. Alternatively microwell strips can be placed upside down on a wet absorbent paper for not longer than 15 minutes. **Do not allow wells to dry.**
- d. **Standard dilution on the microwell plate** (Alternatively the standard dilution can be prepared in tubes - see 9.4.1):
Add 100 μ l of Assay Buffer (1x) in duplicate to all **standard wells**. Pipette 100 μ l of prepared **standard** (see Preparation of Standard 9.5, concentration = 30 ng/ml) in duplicate into well A1 and A2 (see Table 1). Mix the contents of wells A1 and A2 by repeated aspiration and ejection (concentration of standard 1, S1 = 15 ng/ml), and transfer 100 μ l to wells B1 and B2, respectively (see Figure 7). Take care not to scratch the inner surface of the microwells. Continue this procedure 5 times, creating two rows of human MMP-9 standard dilutions ranging from 15.00 to 0.23 ng/ml. Discard 100 μ l of the contents from the last microwells (G1, G2) used.

Figure 7



In case of an **external standard dilution** (see 9.4.1), pipette 100 µl of these standard dilutions (S1 - S7) in the standard wells according to Table 1.

Table 1

Table depicting an example of the arrangement of blanks, standards and samples in the microwell strips:

	1	2	3	4
A	Standard 1 (15.0 ng/ml)	Standard 1 (15.0 ng/ml)	Sample 1	Sample 1
B	Standard 2 (7.5 ng/ml)	Standard 2 (7.5 ng/ml)	Sample 2	Sample 2
C	Standard 3 (3.75 ng/ml)	Standard 3 (3.75 ng/ml)	Sample 3	Sample 3
D	Standard 4 (1.88 ng/ml)	Standard 4 (1.88 ng/ml)	Sample 4	Sample 4
E	Standard 5 (0.94 ng/ml)	Standard 5 (0.94 ng/ml)	Sample 5	Sample 5
F	Standard 6 (0.47 ng/ml)	Standard 6 (0.47 ng/ml)	Sample 6	Sample 6
G	Standard 7 (0.23 ng/ml)	Standard 7 (0.23 ng/ml)	Sample 7	Sample 7
H	Blank	Blank	Sample 8	Sample 8

- e. Add 100 µl of **Assay Buffer (1x)** in duplicate to the **blank wells**.
- f. Add 90 µl of **Assay Buffer (1x)** to the **sample wells**.
- g. Add 10 µl of each **sample** in duplicate to the **sample wells**.
- h. Prepare **Biotin-Conjugate** (see Preparation of Biotin-Conjugate 9.3).
- i. Add 50 µl of **Biotin-Conjugate** to all wells.
- j. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18 to 25°C) for 2 hours, if available on a microplate shaker set at 400 rpm.
- k. Prepare **Streptavidin-HRP** (refer to Preparation of Streptavidin-HRP 9.4).
- l. Remove adhesive film and empty wells. **Wash** microwell strips 4 times according to point c. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- m. Add 100 µl of diluted **Streptavidin-HRP** to all wells, including the blank wells.
- n. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18° to 25°C) for 1 hour, if available on a microplate shaker set at 400 rpm.
- o. Remove adhesive film and empty wells. **Wash** microwell strips 4 times according to point c. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
- p. Pipette 100 µl of **TMB Substrate Solution** to all wells.
- q. Incubate the microwell strips at room temperature (18° to 25°C) for about 10 min. Avoid direct exposure to intense light.

The colour development on the plate should be monitored and the substrate reaction stopped (see next point of this protocol) before positive wells are no longer properly recordable. Determination of the ideal time period for colour development has to be done individually for each assay.

It is recommended to add the stop solution when the highest standard has developed a dark blue colour. Alternatively the colour development can be monitored by the ELISA reader at 620 nm. The substrate reaction should be stopped as soon as Standard 1 has reached an OD of 0.9 – 0.95.

- r. Stop the enzyme reaction by quickly pipetting 100 µl of **Stop Solution** into each well. It is important that the Stop Solution is spread quickly and uniformly throughout the microwells to completely inactivate the enzyme. Results must be read immediately after the Stop Solution is added or within one hour if the microwell strips are stored at 2 - 8°C in the dark.
- s. Read absorbance of each microwell on a spectro-photometer using 450 nm as the primary wave length (optionally 620 nm as the reference wave length; 610 nm to 650 nm is acceptable). Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions by using the blank wells. Determine the absorbance of both the samples and the standards.

Note: In case of incubation without shaking the obtained O.D. values may be lower than indicated below. Nevertheless the results are still valid.

11. Calculation of Results

- Calculate the average absorbance values for each set of duplicate standards and samples. Duplicates should be within 20 per cent of the mean value.
- Create a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard concentration on the ordinate against the human MMP-9 concentration on the abscissa. Draw a best fit curve through the points of the graph (a 5-parameter curve fit is recommended).
- To determine the concentration of circulating human MMP-9 for each sample, first find the mean absorbance value on the ordinate and extend a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, extend a vertical line to the abscissa and read the corresponding human MMP-9 concentration.
- **If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:10 (10 µl sample + 90 µl Assay Buffer (1x)) on the plate, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the final dilution factor (depending on the predilution factor), for example:**
Not prediluted samples: x 10
1:10 prediluted samples: x 100
1:25 prediluted samples: x 250
- **Calculation of samples with a concentration exceeding standard 1 will result in incorrect, low human MMP-9 levels (Hook Effect). Such samples require further external predilution according to expected human MMP-9 values with Assay Buffer (1x) in order to precisely quantitate the actual human MMP-9 level.**
- It is suggested that each testing facility establishes a control sample of known human MMP-9 concentration and runs this additional control with each assay. If the values obtained are not within the expected range of the control, the assay results may be invalid.
- A representative standard curve is shown in Figure 8. This curve cannot be used to derive test results. Each laboratory must prepare a standard curve for each group of microwell strips assayed.

Figure 8

Representative standard curve for human MMP-9 ELISA. Human MMP-9 was diluted in serial 2-fold steps in Assay Buffer (1x). Do not use this standard curve to derive test results. A standard curve must be run for each group of microwell strips assayed.

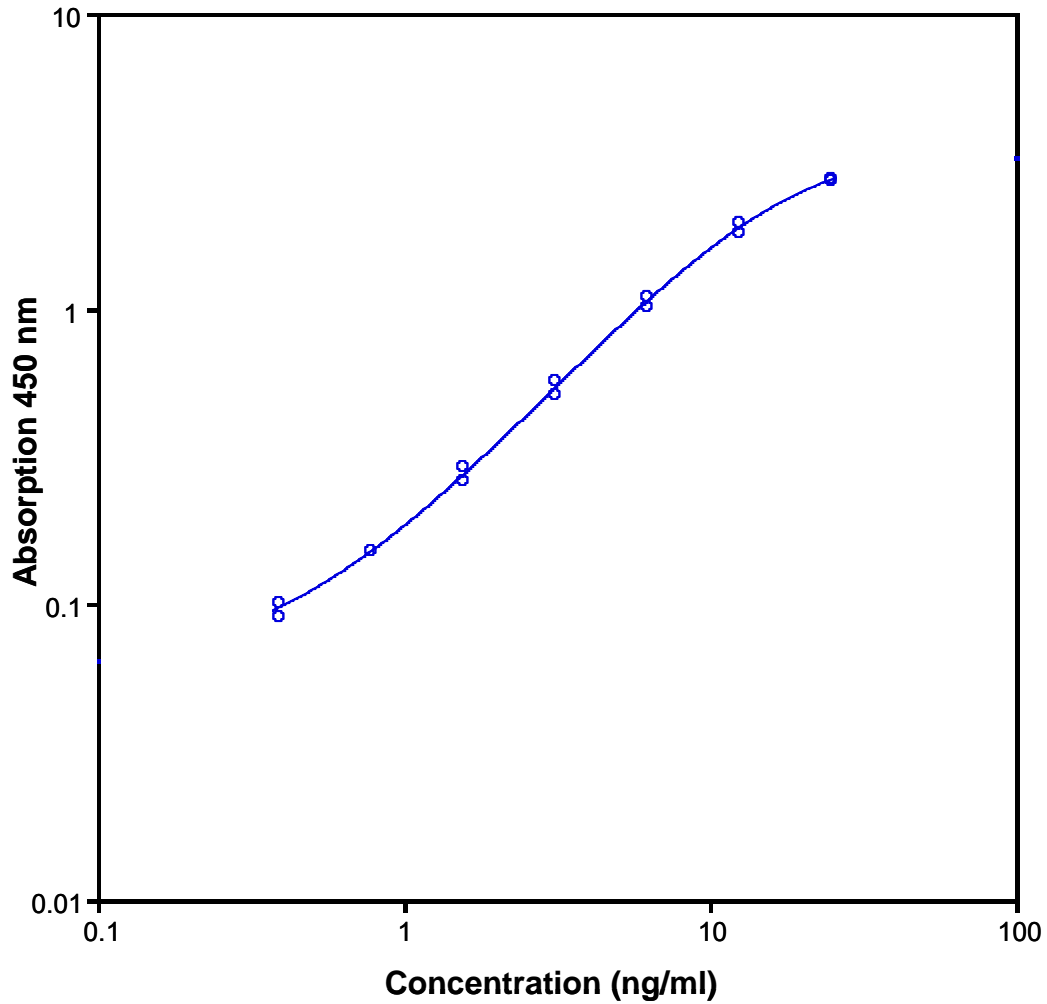


Table 2

Typical data using the human MMP-9 ELISA

Measuring wavelength: 450 nm

Reference wavelength: 620 nm

Standard	Human MMP-9 Concentration (ng/ml)	O.D. at 450 nm	Mean O.D. at 450 nm	C.V. (%)
1	15.00	2.69 2.76	2.72	1.2
2	7.50	1.81 1.95	1.88	3.9
3	3.75	1.01 1.10	1.06	3.7
4	1.88	0.51 0.57	0.54	4.9
5	0.94	0.26 0.29	0.28	4.7
6	0.47	0.15 0.15	0.15	0.1
7	0.23	0.09 0.10	0.10	3.2
Blank	0	0.04 0.03	0.04	14.3

The OD values of the standard curve may vary according to the conditions of assay performance (e.g. operator, pipetting technique, washing technique or temperature effects). Furthermore shelf life of the kit may affect enzymatic activity and thus colour intensity. Values measured are still valid.

12. Limitations

- Since exact conditions may vary from assay to assay, a standard curve must be established for every run.
- Bacterial or fungal contamination of either screen samples or reagents or cross-contamination between reagents may cause erroneous results.
- Disposable pipette tips, flasks or glassware are preferred, reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed of all detergents before use.
- Improper or insufficient washing at any stage of the procedure will result in either false positive or false negative results. Empty wells completely before dispensing fresh wash solution, fill with Wash Buffer as indicated for each wash cycle and do not allow wells to sit uncovered or dry for extended periods.
- The use of radioimmunotherapy has significantly increased the number of patients with human anti-mouse IgG antibodies (HAMA). HAMA may interfere with assays utilizing murine monoclonal antibodies leading to both false positive and false negative results. Serum samples containing antibodies to murine immunoglobulins can still be analysed in such assays when murine immunoglobulins (serum, ascitic fluid, or monoclonal antibodies of irrelevant specificity) are added to the sample.

13. Performance Characteristics

13.1. Sensitivity

The limit of detection of human MMP-9 defined as the analyte concentration resulting in an absorbance significantly higher than that of the dilution medium (mean plus 2 standard deviations) was determined to be 0.05 ng/ml (mean of 6 independent assays).

13.2. Reproducibility

13.2.1. Intra-assay

Reproducibility within the assay was evaluated in 4 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 7 serum samples containing different concentrations of human MMP-9. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human MMP-9 concentration and the coefficient of variation for each sample (see Table 3). The calculated overall intra-assay coefficient of variation was 7.3%.

Table 3

The mean human MMP-9 concentration and the coefficient of variation for each sample

Sample	Experiment	Mean Human MMP-9 Concentration (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	1424.8	4.4
	2	1314.8	1.3
	3	1496.3	5.8
	4	1517.1	2.6
2	1	1324.7	16.9
	2	1231.5	17.5
	3	1297.7	17.6
	4	1412.3	16.9
3	1	105.1	5.5
	2	101.7	6.2
	3	103.8	5.0
	4	130.2	7.7
4	1	1709.0	2.1
	2	1747.7	3.2
	3	1752.8	2.4
	4	1889.9	8.2
5	1	94.1	12.9
	2	87.2	7.4
	3	98.4	2.8
	4	115.9	8.2
6	1	67.3	5.8
	2	68.7	5.0
	3	69.1	6.8
	4	86.4	6.5
7	1	95.9	7.6
	2	91.3	3.5
	3	96.3	10.0
	4	131.9	4.5

13.2.2. Inter-assay

Assay to assay reproducibility within one laboratory was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 7 serum samples containing different concentrations of human MMP-9. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human MMP-9 concentration and the coefficient of variation calculated on 18 determinations of each sample (see Table 4). The calculated overall inter-assay coefficient of variation was 10.2%.

Table 4

The mean human MMP-9 concentration and the coefficient of variation of each sample

Sample	Mean Human MMP-9 Concentration (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1438.2	6.3
2	1316.5	5.7
3	110.2	12.2
4	1774.9	4.5
5	98.9	12.4
6	72.9	12.4
7	103.9	18.1

13.3. Spike Recovery

The spike recovery was evaluated by spiking 4 levels of human MMP-9 into serum. The amount of endogenous human MMP-9 in unspiked serum was subtracted from the spike values.

Recoveries were determined in 2 independent experiments with 4 replicates each. The overall mean recovery was 103.1%

13.4. Dilution Parallelism

Serum samples with different levels of human MMP-9 were analysed at serial 2 fold dilutions with 4 replicates each.

The recovery ranged from 103.2% to 114.0% with an overall recovery of 107.4% (see Table 5).

Table 5

Sample	Dilution	Expected Human MMP-9 Concentration (ng/ml)	Observed Human MMP-9 Concentration (ng/ml)	Recovery of Expected human MMP-9 Concentration (%)
1	1:250		1419.0	
	1:500	709.5	809.1	114.0
	1:1000	354.7	372.1	104.9
	1:2000	177.4	186.8	105.3
2	1:250		778.6	
	1:500	389.3	401.6	103.2
	1:1000	194.6	207.7	106.7
	1:2000	97.3	107.3	110.3

13.5. Sample Stability

13.5.1. Freeze-Thaw Stability

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C and thawed 5 times, and the human MMP-9 levels determined. There was no significant loss of human MMP-9 immunoreactivity detected by freezing and thawing.

13.5.2. Storage Stability

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C, 2-8°C, room temperature (RT) and at 37°C, and the human MMP-9 level determined after 24 h. There was no significant loss of human MMP-9 immunoreactivity detected under above conditions.

13.6. Specificity

The cross reactivity and interference of circulating factors of the immune system was evaluated by spiking these proteins at physiologically relevant concentrations into a human MMP-9 positive sample. There was no cross reactivity or interference detected.

13.7. Expected Values

Serum as well as plasma samples from apparently healthy donors were tested for human MMP-9. The detected human MMP-9 levels ranged between 2.0 and 139.4 ng/ml for serum, between 9.6 and 87.3 ng/ml for plasma (citrate) and between 9.5 and 80.2 ng/ml for plasma (heparin). Elevated human MMP-9 levels depend on the type of immunological disorder.

14. Ordering Information

North America

Technical Support:

Research Products:
888.810.6168
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Clinical Products:
877.726.8559
858.642.2058
tech@eBioscience.com

Customer Service:

888.999.1371
858.642.2058
info@eBioscience.com

Fax:

858.642.2046

Europe/International*

Technical Support:

+43 1 796 40 40-120
tech@eBioscience.com

Customer Service:

+43 1 796 40 40-304
europe@eBioscience.com

Fax:

+43 1 796 40 40-400



Bender MedSystems GmbH
Campus Vienna Biocenter 2
1030 Vienna, Austria
www.eBioscience.com

* Customers outside North America and Europe may contact their eBioscience distributor listed on our website at www.eBioscience.com/distributors.

15. Reagent Preparation Summary

15.1. Wash Buffer (1x)

Add **Wash Buffer Concentrate** 20x (50 ml) to 950 ml distilled water.

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

15.2. Assay Buffer (1x)

Add **Assay Buffer Concentrate** 20x (5 ml) to 95 ml distilled water.

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

15.3. Biotin-Conjugate

Make a 1:100 dilution of **Biotin-Conjugate** in Assay Buffer (1x):

Number of Strips	Biotin-Conjugate (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

15.4. Streptavidin-HRP

Make a 1:200 dilution of **Streptavidin-HRP** in Assay Buffer (1x):

Number of Strips	Streptavidin-HRP (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

15.5. Human MMP-9 Standard

Reconstitute lyophilized **human MMP-9 standard** with distilled water. (Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial.)

16. Test Protocol Summary

1. Predilute pathological samples with Assay Buffer (1x) 1:10 – 1:25. Samples from apparently healthy donors do not require predilution.
2. Determine the number of microwell strips required.
3. Wash microwell strips twice with Wash Buffer.
4. Standard dilution on the microwell plate: Add 100 µl Assay Buffer (1x), in duplicate, to all standard wells. Pipette 100 µl prepared standard into the first wells and create standard dilutions by transferring 100 µl from well to well. Discard 100 µl from the last wells.
Alternatively external standard dilution in tubes (see 9.4.1): Pipette 100 µl of these standard dilutions in the microwell strips.
5. Add 100 µl Assay Buffer (1x), in duplicate, to the blank wells.
6. Add 90 µl Assay Buffer (1x) to sample wells.
7. Add 10 µl sample in duplicate, to designated sample wells.
8. Prepare Biotin-Conjugate.
9. Add 50 µl Biotin-Conjugate to all wells.
10. Cover microwell strips and incubate 2 hours at room temperature (18° to 25°C).
11. Prepare Streptavidin-HRP.
12. Empty and wash microwell strips 4 times with Wash Buffer.
13. Add 100 µl diluted Streptavidin-HRP to all wells.
14. Cover microwell strips and incubate 1 hour at room temperature (18° to 25°C).
15. Empty and wash microwell strips 4 times with Wash Buffer.
16. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to all wells.
17. Incubate the microwell strips for about 10 minutes at room temperature (18° to 25°C).
18. Add 100 µl Stop Solution to all wells.
19. Blank microwell reader and measure colour intensity at 450 nm.

- **Note: If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:10 (10 µl sample + 90 µl Assay Buffer (1x)) on the plate, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the final dilution factor (depending on the predilution factor), for example:**
Not prediluted samples: x 10
1:10 prediluted samples: x 100
1:25 prediluted samples: x 250

Протокол

Human MMP-9 Platinum ELISA

1.1. Реагенти включени в кита

1 Плака, покрита с алуминиева опаковка, натоварена със съответното моноклонално антитяло.

1 Виалка (100 µl) **Biotin-Conjugate anti-human MMP-9** monoclonal antibody

1 Виалка (150 µl) **Streptavidin-HRP**

2 Виалки **MMP-9 Standard** лиофилизирани, 200 ng/ml след разреждане

1 виалка (5 ml) **Assay Buffer Concentrate 20x** (PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)

1 Бутилка (50мл) **Wash Buffer Concentrate 20x** (phosphate-buffered saline with 1% Tween 20)

1 Виалка (15мл) **Substrate Solution** (tetramethyl-benzidine-TMB)

1 Виалка (15мл) **Stop Solution** (1M Phosphoric acid)

1 Виалка (0,4 мл) синьо багрило

1 Виалка (0,4 мл) зелено багрило

1 Виалка (0,4 мл) червено багрило

4 Адхезивни филма

1.2 Инструкции за съхранение

Съхранявайте компонентите на кита на 2-8С.. Веднага след употреба останалите реактиви трябва да бъдат върнати за съхранение при отбелязаните температури.

1.3 Събиране на пробите

Супернатанта от клетъчна култура, серум, плазма (EDTA, цитрат и хепарин) и урина са тествани с този кит. Други биологични проби също могат да се определят с този тест.

Проби съдържащи видима утайка, трябва да бъдат преципитирани преди употреба. Пробите трябва да бъдат съхранявани в замразено състояние на -20С, за да се избегне затуба на биоактивността на **MMP-9** . Ако пробите се работят в рамките на 24 часа, могат да бъдат съхранявани от 2С до 8С. Избягвайте цикли на замръзване и размразяване. Преди тестване замразената проба, трябва да се доведе до стайна температура, чрез внимателно разбъркване.

1.4.Подготовка на реагентите и пробите

Buffer Concentrate трябва да бъде доведен до стайна температура преди започване на теста. Ако са се образували кристали в буферната среда, тя трябва да бъде затоплена леко, докато кристалите се разтворят напълно.

Приготвяне на **Wash Buffer Concentrate 1x** - Изсипете цялото съдържание на **Wash Buffer Concentrate (50мл) 20x** в чист 1000 мл градуиран цилиндър и доведете до краен обем 1000 мл с чиста дестилирана или дейонизирана вода. Разбъркайте леко, за да се избегне образуването на пяна. Прехвърлете в чиста бутилка и съхранявайте от 2С до 25С. Моля имайте предвид, че така приготвения буфер (1x) е стабилен в продължение на 30 дни.

Можете да пригответе буфер в съответствие броя на използваните стрипове, съгласно долната таблица:

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x) (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

Приготвяне на **Assay Buffer** – Изсипете цялото съдържание на Assay Buffer 20x (5мл) в

чист 100 мл градуиран цилиндър и доведете до краен обем 100мл с чиста дестилирана или дейонизирана вода. Разбъркайте леко, за да се избегне образуването на пяна. Прехвърлете в чиста бутилка и съхранявайте от 2С до 25С. Моля имайте предвид, че така приготвения буфер (1x) е стабилен в продължение на 30 дни

Можете да пригответе буфер в съответствие броя на използваните стрипове, съгласно долната таблица:

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (20x) (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

Приготвяне на Биотинов конюгат – Биотиновият конюгат трябва да се използва в рамките на 30 мин. След приготвяне. Направете 1:100 разреждане на концентрирания биотинов конюгат с Assay buffer 1x в съответствие с таблицата:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

Приготвяне на Streptavidin-HRP - Streptavidin-HRP трябва да се използва в рамките на 30 мин. След приготвяне. Направете 1:200 разреждане на концентрирания биотинов конюгат с Assay buffer 1x в съответствие с таблицата:

Number of Strips	Streptavidin-HRP (ml)	Assay Buffer (1x) (ml)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

Приготвяне на MMP-9 Стандарти

Разтворете стандарта чрез добавянето на дестилирана вода (обемът е посочен на етикета на виалката), като разбърквате добре до достигането на концентрация на стандарта 200 ng/ml и оставете да се доразтвори за 10-30 минути. След употреба останалия стандарт не може да се използва и трябва да се изхвърли.

Концентрираните човешки **MMP-9** стандарт трябва да се разреждат 1:1000 с Assay Buffer (1x) точно преди да се използват в чиста пластмасова епруветка според следната схема за разреждане:

Разреждане 1: 100 ul концентрирана човешки **MMP-9** стандарт + 900 микролитра Assay Buffer (1x) (концентрацията на разреждане 1 = 20 ng / мл).

Разреждане 2: 10 μ l разреждане 1 + 990 микролитра Assay Buffer (1x) (концентрацията на разреждане 2 = 200 pg / мл).

Разклатете внимателно, за да се смесят.

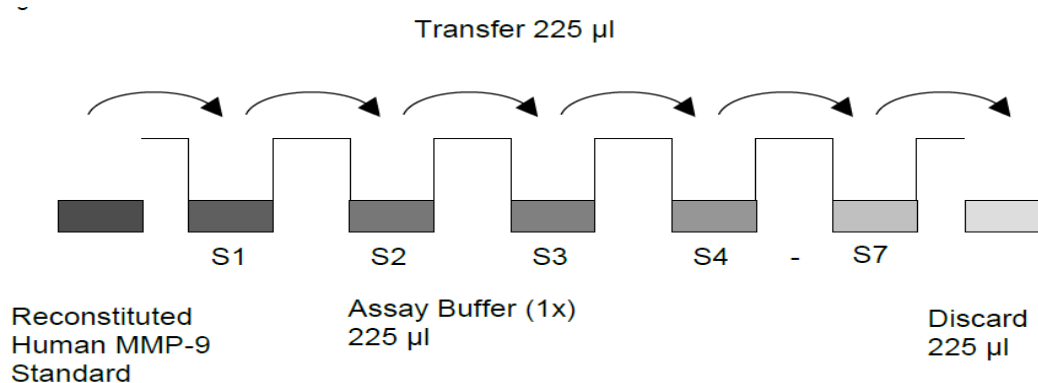
Стандартните разреждания могат да се направят директно върху стриповете (погледнете точка B от тестовия протокол) или алтернативно в епруветки, както е описано по-долу на фигурата.

Отпипетирайте по 225 микролитра Sample Diluent във всяка епруветка и прехвърлете 225 микролитра от разреждения стандарт в първата епруветка. Направете серийните разреждания.

Повторете серийните разреждания още 5 пъти, като по този начин, създавате точките на стандартната крива.

В бланк накапете Sample Diluent

Серийни разреждания на стандартите:



Добавяне на цветни реактиви – син, зелен и червен.

За да помогнем на нашите клиенти да се избегнат всякакви грешки в пипетирането на Platinum ELISA кита, eBioscience предлага инструмент, който помага да се контролира добавянето на дори много малки обеми, като добавя отличителни цветове за всяка стъпка от процедурата. Тази процедура е задължителна, по никакъв начин не компрометираща резултатите от тестовете, и е предназначена да помогне на клиента с изпълнението на теста, но също така може да се пропусне.

Алтернатива, цветните разтвори от така приготвените реагенти (Blue-боядисване, Green-боядисване, Red-боядисване) могат да бъде добавени към реагентите преди разрежданията в съответствие със следните насоки:

1. Diluent: 1:250

5 ml Assay Buffer (1x)	20 μ l Blue-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	48 μ l Blue-Dye
50 ml Assay Buffer (1x)	200 μ l Blue-Dye

2. Biotin-Conjugate: 1:100

3 ml Assay Buffer (1x)	30 μ l Green-Dye
6 ml Assay Buffer (1x)	60 μ l Green-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	120 μ l Green-Dye

3. Streptavidin-HRP: 1:250

6 ml Assay Buffer (1x)	24 μ l Red-Dye
12 ml Assay Buffer (1x)	48 μ l Red-Dye

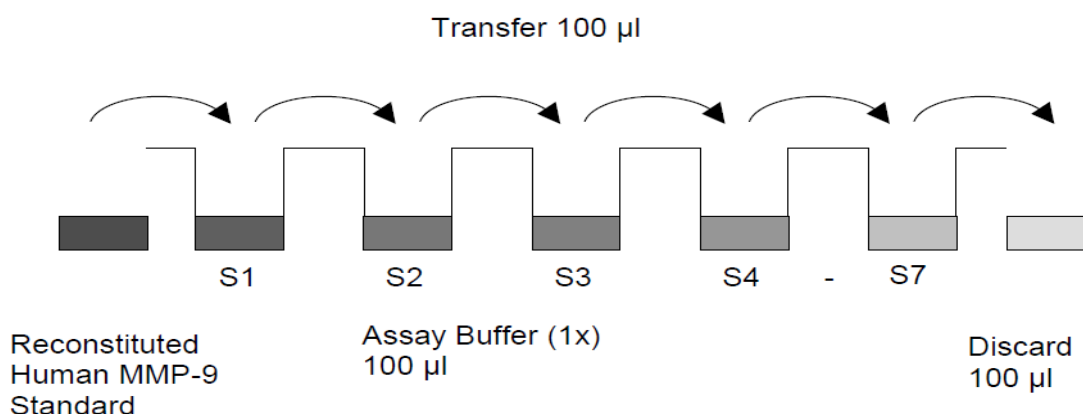
1.5 Тест протокол

А. Определете броя стрипове, необходими за желания брой проби плюс стрипове за blank и стандарти (оцветени). Всяка проба, стандарт и blank следва да се дублират. Свалете необходимите стрипове от холдера, а останалите съхранявайте при 2-8С плътно затворени с алуминиево фолио. Поставете стриповете, съдържащи стандартите в позиция А1/А2 до Н1/Н2 (таблица 1)

Б. Измийте 2 пъти стриповете с около 400 микролитра миещ буфер на ямка като аспирирате добре между измиванията. Оставете миещия буфер да престои **10-15** сек преди аспирация, като внимавате да не надраскате повърхността на ямките. След последното измиване натиснете стриповете надолу върху абсорбираща хартия или кърпа за отстраняване на излишния миещ буфер. **Не позволявайте ямките да изсъхнат.**

В. Разреждания на стандартите върху стриповете:

В случай, че правите разрежданията на стандартите направо върху стриповете, следвайте схемата по-долу



Накапете по 100 микролитра Sample Diluent във всяка ямка в две повторения. Отпипетирайте 100 микролитра от първоначално приготвеният (разреден стандарт – 200 pg/ml) и направете падащите разреждания (трансфер на 100 микролитра). Повторете процедурата 5 пъти, като по-този начин създадете стандартната крива на ММР-9

В случаите на външно разреждане на стандартите (в епруветки), следвайте таблица 1.

Таблица 1. Таблица изобразяваща примерна подредба за подреждане на проби, стандарти и blank в стрипове.

	1	2	3	4
A	Standard 1 (15 ng/ml)	Standard 1 (15 ng/ml)	Sample 1	Sample 1
B	Standard 2 (7.5 ng/ml)	Standard 2 (7.5 ng/ml)	Sample 2	Sample 2
C	Standard 3 (3.75 ng/ml)	Standard 3 (3.75 ng/ml)	Sample 3	Sample 3
D	Standard 4 (1.88 ng/ml)	Standard 4 (1.88 ng/ml)	Sample 4	Sample 4
E	Standard 5 (0.94 ng/ml)	Standard 5 (0.94 ng/ml)	Sample 5	Sample 5
F	Standard 6 (0.47ng/ml)	Standard 6 (0.47ng/ml)	Sample 6	Sample 6
G	Standard 7 (0.23ng/ml)	Standard 7 (0.23ng/ml)	Sample 7	Sample 7
H	Blank	Blank	Sample 8	Sample 8

Г. Добавете по 100 микролитра Sample Diluent в Blank.

Д. Добавете по 50 микролитра Sample Diluent в ямките за пробите.

Е. Добавете по 50 микролитра от всяка проба (в две повторения) в определените ямки и смесете внимателно съдържанието.

Ж. Пригответе **Biotin-Conjugate** и прибавете по 50 микролитра във всяка ямка

З. Покрийте с адхезивно фолио и инкубирайте на стайна температура (18°C to 25°C) **за 2 часа** (ако притежавате шейкър – при 400 rpm).

И. Пригответе **Streptavidin-HRP**

Й. Премахнете адхезивното фолио и измийте 3 пъти стриповете с около 400 микролитра миеш буфер на ямка като аспирирате добре между измиванията. Оставете миешия буфер да престои 10-15 сек преди аспирация, като внимавате да не надраскате повърхността на ямките.

След последното измиване натиснете стриповете надолу върху абсорбираща хартия

или кърпа за отстраняване на излишния миеш буфер. Не позволявайте ямките да изсъхнат.

К. Отпипетирайте по 100 микролитра **Streptavidin-HRP** , включително и blank.

Л. Покрийте с адхезивно фолио и инкубирайте на стайна температура (18°C to 25°C) **за 1 час** (ако притежавате шейкър – при 400 rpm).

М. Премахнете адхезивното фолио и измийте 3 пъти стриповете с около 400 микролитра миеш буфер на ямка като аспирирате добре между измиванията. Оставете миешия буфер да престои 10-15 сек преди аспирация, като внимавате да не надраскате повърхността на ямките.

След последното измиване натиснете стриповете надолу върху абсорбираща хартия или кърпа за отстраняване на излишния миеш буфер. Не позволявайте ямките да изсъхнат.

Н. Отпипетирайте по 100 микролитра **TMB Substrate Solution**, включително и blank.

О. Покрийте с адхезивно фолио и инкубирайте на стайна температура (18°C to 25°C) за 10 мин., като предпазвате от пряка светлина.

Развитието на цветната реакция трябва да бъде наблюдавано и реакцията да бъде спряна (вижте следващата точка от протокола) преди да се достигне максималната стойност на абсорбция, която апаратът може да отчете. Определянето на идеалния период на развитие на цветната реакция трябва да бъде направено индивидуално за всяка проба.

Препоръчително е да добавите Stop Solution, когато най-високият стандарт достигне тъмно син цвят. Може да следите реакцията чрез ELISA ридер на 620nm, като реакцията трябва да бъде спряна веднага след като Standard 1 достигне OD 0,9-0,95.

П. Спрете ензимната реакция чрез бързо отпипетиране със 100 микролитра Stop Solution във всяка ямка, включително и blank. Резултатите трябва да бъдат отчетени веднага след като прибавите Stop Solution или в рамките на 1 час, като съхранявате стриповете от 2С-8С на тъмно.

Й. Отчетете абсорбцията спектрофотометрично – 450nm дължина на вълната (по желание може да използвате 620nm). Определя се абсорбцията и на двете проби и стандартите.

В случаи на инкубация без шейкър получените стойности могат да бъдат по-ниски от посочените по-долу, като независимо от това резултатите са валидни.

1.6. Отчитане на резултатите

- Изчислете средната стойност на абсорбцията на всяка серия от дублираните стандарти и проби.
- Създайте стандартна крива въз основа на абсорбцията за всяка стандартна концентрация по ординатата срещу концентрацията на MMP-9 по абсисата. Начертайте крива през точките на графиката (предпочита се 5 параметъра)
- Определете концентрацията на всеки от циркулиращите MMP-9 за всяка проба, като първо намерете средната стойност на абсорбцията по ординатата, удължете вертикалната линия на абсисата и прочетете кореспондиращата концентрация на MMP-9
- **Ако сте разрешили пробите 1:2 следователно концентрацията от стандартната крива трябва да се умножи по фактора на разреждане (в случая x2)**
- **Изчисляването на пробите с концентрация надвишаваща Standard 1, може да доведе до отчитането на недостовърни ниски нива на MMP-9. Такива проби**

изискват допълнително външно разреждане със **Sample Diluent** за да се определи точно количеството на актуалните нива на MMP-9.

- Предполага се, че при всеки тест се установяват контролна нива на известната (по литературни данни) концентрация на MMP-9. Ако получените стойности не са в рамките на очаквания обхват на контролата, резултатите от теста могат да бъдат невалидни.
- Характерната стандартна крива е показана на фиг. Тази крива НЕ може да бъде използвана за извеждане на резултатите от теста. Всяка лаборатория трябва да направи стандартна крива за анализа на всяка група стрипове.

Забележка: Налице е общ фактор на разреждането на проби дължащи се на конюгата, които трябва да бъдат включени в изчисленията. Пробите са в краен обем от 100 микролитра на ямка (50 микролитра **Sample Diluent** и 50 микролитра проба). Това е разреждане 1:2. Останалите 50 микролитра до достигане на обема от 150 микролитра се дължат на 50 микролитра **HRP-Conjugate** в ямките.

50 микролитра **Sample Diluent** и 50 микролитра **HRP-Conjugate**, резултат от 100 микролитра реконституиран обем, добавянето на 50 микролитра проба (50 микролитра плюс 50 микролитра проба = 1:2 разреждане).

Фиг. Характерна стандартна крива за MMP-9 Platinum ELISA. Не използвайте тази стандартна крива за да обясните резултатите от теста. Стандартната крива трябва да се начертае и да анализира всяка една група стрипове.

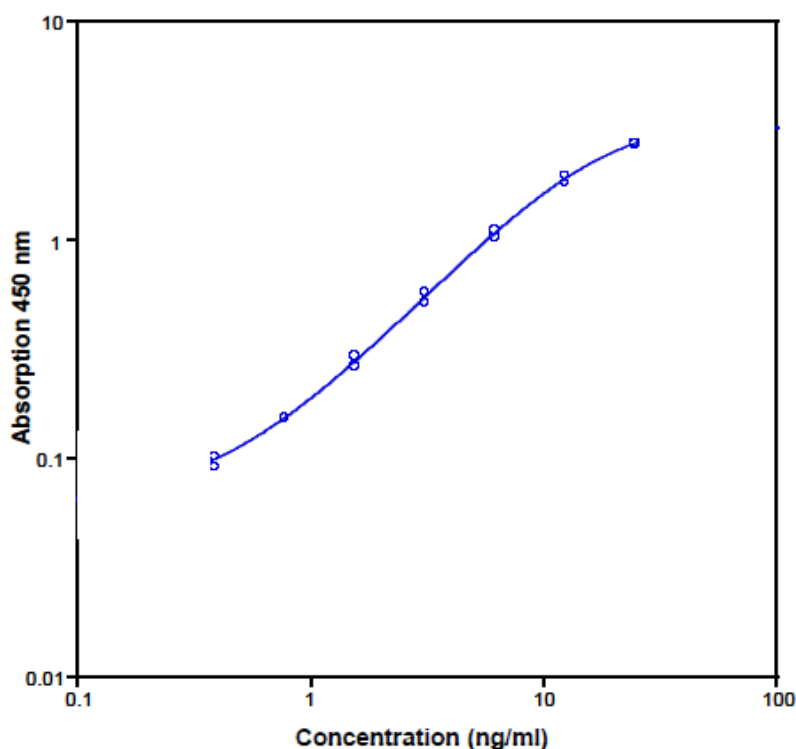


Таблица.2 Типични данни, получени при използването на човешки MMP-9 Platinum ELISA кит
Измерване на дължинана вълната: 450Nm
Референтна дължина на вълната: 620 Nm

Standard	Human MMP-9 Concentration (ng/ml)	O.D. at 450 nm	Mean O.D. at 450 nm	C.V. (%)
1	15.00	2.69 2.76	2.72	1.2
2	7.50	1.81 1.95	1.88	3.9
3	3.75	1.01 1.10	1.06	3.7
4	1.88	0.51 0.57	0.54	4.9
5	0.94	0.26 0.29	0.28	4.7
6	0.47	0.15 0.15	0.15	0.1
7	0.23	0.09 0.10	0.10	3.2
Blank	0	0.04 0.03	0.04	14.3

Оптичните стойности на стандартната крива могат да варират в зависимост от условията на експеримента (оператор, техника на пипетиране, техника на измиване и температурни разлики). Освен това срокът на годност на кита може да повлияе ензимната активност и по този начин и интензитета на цвета. Измерените стойности са все още валидни.

1.7. Ограничения

- Тъй като точните условия могат да варират от проба до проба, стандартните криви трябва да се установяват за всяко изследване
- Бактериални и гъбични контаминации в пробите или замърсявания в реагентите също могат да доведат до погрешни резултати
- Използвайте консумативи само за еднократна употреба
- Неправилно или недостатъчно измиване на всеки етап от процедурата може да доведе до фалшиви положителни или отрицателни резултати. Не позволявайте ямките да останат сухи в дълги периоди от време.

1.8. Работни характеристики

1.8.1. Чувствителност

Границата на детекция на MMP-9 се определя като концентрация на анализа, в резултат на абсорбция, значително по висока от тази на разреждащата среда (означава плюс две стандартни отклонения) и се определя да бъде 0,99 pg/ml (средно от 6 независими анализа)

Human CD83 antigen (CD83) ELISA kit

Catalog Number. MBS924667

For the quantitative determination of human CD83 antigen (CD83) concentrations in serum, plasma, tissue homogenates.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

MYBiosource.com

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. Antibody specific for CD83 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any CD83 present is bound by the immobilized antibody. After removing any unbound substances, a biotin-conjugated antibody specific for CD83 is added to the wells. After washing, avidin conjugated Horseradish Peroxidase (HRP) is added to the wells. Following a wash to remove any unbound avidin-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of CD83 bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

DETECTION RANGE

7.8 pg/ml-500 pg/ml.

SENSITIVITY

The minimum detectable dose of human CD83 is typically less than 1.95 pg/ml. The sensitivity of this assay, or Lower Limit of Detection (LLD) was defined as the lowest protein concentration that could be differentiated from zero. It was determined the mean O.D value of 20 replicates of the zero standard added by their three standard deviations.

SPECIFICITY

This assay has high sensitivity and excellent specificity for detection of human CD83. No significant cross-reactivity or interference between human CD83 and analogues was observed.

Note: Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between human CD83 and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist.

PRECISION

Intra-assay Precision (Precision within an assay): CV%<8%

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess.

Inter-assay Precision (Precision between assays): CV%<10%

Three samples of known concentration were tested in twenty assays to assess.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- **FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with Sample Diluent and repeat the assay.
- Any variation in Sample Diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- This assay is designed to eliminate interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

MATERIALS PROVIDED

Reagents	Quantity
Assay plate (12 x 8 coated Microwells)	1(96 wells)
Standard (Freeze dried)	2
Biotin-antibody (100 x concentrate)	1 x 120 µl
HRP-avidin (100 x concentrate)	1 x 120 µl
Biotin-antibody Diluent	1 x 10 ml
HRP-avidin Diluent	1 x 10 ml
Sample Diluent	1 x 20 ml
Wash Buffer (25 x concentrate)	1 x 20 ml
TMB Substrate	1 x 10 ml
Stop Solution	1 x 10 ml
Adhesive Strip (For 96 wells)	4
Instruction manual	1

STORAGE

Unopened kit	Store at 2 - 8°C. Do not use past kit expiration date	
Opened kit	Coated assay plate	May be stored for up to 1 month at 2 - 8°C. Try to keep it in a sealed aluminum foil bag, and avoid the damp.
	Standard	May be stored for up to 1 month at 2 - 8°C. If don't make recent use, better keep it store at -20°C.
	Biotin-antibody	
	HRP-avidin	
	Biotin-antibody Diluent	May be stored for up to 1 month at 2 - 8°C.
	HRP-avidin Diluent	
	Sample Diluent	
	Wash Buffer	
	TMB Substrate	
Stop Solution		

*Provided this is within the expiration date of the kit.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- An incubator which can provide stable incubation conditions up to 37°C±0.5°C.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- Absorbent paper for blotting the microtiter plate.
- 100 mL and 500 mL graduated cylinders.
- Deionized or distilled water.
- Pipettes and pipette tips.
- Test tubes for dilution.

PRECAUTIONS

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

MYBioSource.com

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

- **Serum** Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for two hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 15 minutes at 1000 ×g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- **Plasma** Collect plasma using EDTA, or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 ×g at 2-8°C within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- **Tissue Homogenates** 100mg tissue was rinsed with 1X PBS, homogenized in 1 ml of 1X PBS and stored overnight at -20°C. After two freeze-thaw cycles were performed to break the cell membranes, the homogenates were centrifuged for 5 minutes at 5000 x g, 2 - 8°C. The supernate was assayed and removed immediately. Alternatively, aliquot and store samples at -20°C or -80°C. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. Avoid repeated freeze-thaw cycles

SAMPLE PREPARTION

Serum and plasma samples require a 10-fold dilution into Sample Diluent. The suggested 10-fold dilution can be achieved by adding 25 μ l sample to 225 μ l of Sample Diluent. The recommended dilution factor is for reference only. The optimal dilution factor should be determined by users according to their particular experiments.

Note:

1. We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
2. Samples to be used within 5 days may be stored at 2-8 $^{\circ}$ C, otherwise samples must be stored at -20 $^{\circ}$ C (\leq 1month) or -80 $^{\circ}$ C (\leq 2month) to avoid loss of bioactivity and contamination.
3. Grossly hemolyzed samples are not suitable for use in this assay.
4. If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of the kit is necessary.
5. Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments.
6. Tissue or cell extraction samples prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected ELISA results due to the impacts of certain chemicals.
7. Owing to the possibility of mismatching between antigen from other resource and antibody used in our kits (e.g., antibody targets conformational epitope rather than linear epitope), some native or recombinant proteins from other manufacturers may not be recognized by our products.
8. Influenced by the factors including cell viability, cell number and also sampling time, samples from cell culture supernatant may not be detected by the kit.
9. Fresh samples without long time storage are recommended for the test. Otherwise, protein degradation and denaturalization may occur in those samples and finally lead to wrong results.

REAGENT PREPARATION

Note:

- **Kindly use graduated containers to prepare the reagent. Please don't prepare the reagent directly in the Diluent vials provided in the kit.**
- Bring all reagents to room temperature (18-25°C) before use for 30min.
- Prepare fresh standard for each assay. Use within 4 hours and discard after use.
- Making serial dilution in the wells directly is not permitted.
- Please carefully reconstitute Standards according to the instruction, and avoid foaming and mix gently until the crystals have completely dissolved. To minimize imprecision caused by pipetting, use small volumes and ensure that pipettors are calibrated. It is recommended to suck more than 10µl for once pipetting.
- Distilled water is recommended to be used to make the preparation for reagents or samples. Contaminated water or container for reagent preparation will influence the detection result.

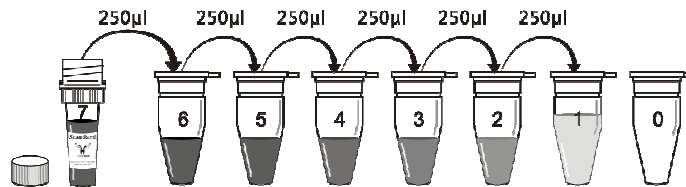
1. **Biotin-antibody (1x)** - Centrifuge the vial before opening.
Biotin-antibody requires a 100-fold dilution. A suggested 100-fold dilution is 10 µl of **Biotin-antibody** + 990 µl of **Biotin-antibody Diluent**.
2. **HRP-avidin (1x)** - Centrifuge the vial before opening.
HRP-avidin requires a 100-fold dilution. A suggested 100-fold dilution is 10 µl of **HRP-avidin** + 990 µl of **HRP-avidin Diluent**.
3. **Wash Buffer(1x)**- If crystals have formed in the concentrate, warm up to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 20 ml of Wash Buffer Concentrate (25 x) into deionized or distilled water to prepare 500 ml of Wash Buffer (1 x).

4. **Standard**

Centrifuge the standard vial at 6000-10000rpm for 30s.

Reconstitute the **Standard** with 1.0 ml of **Sample Diluent**. Do not substitute other diluents. This reconstitution produces a stock solution of 500 pg/ml. Mix the standard to ensure complete reconstitution and allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 250 μ l of **Sample Diluent** into each tube (S0-S6). Use the stock solution to produce a 2-fold dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted Standard serves as the high standard (500 pg/ml). **Sample Diluent** serves as the zero standard (0 pg/ml).



Tube	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/ml	500	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	0

ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. It is recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Refer to the Assay Layout Sheet to determine the number of wells to be used and put any remaining wells and the desiccant back into the pouch and seal the ziploc, store unused wells at 4°C.
3. Add 100µl of standard and sample per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at 37°C. A plate lay out is provided to record standards and samples assayed.
4. Remove the liquid of each well, **don't wash**.
5. Add 100µl of **Biotin-antibody (1x)** to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C. (**Biotin-antibody (1x)** may appear cloudy. Warm up to room temperature and mix gently until solution appears uniform.)
6. Aspirate each well and wash, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (200µl) using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser, or autowasher, and let it stand for 2 minutes, complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
7. Add 100µl of **HRP-avidin (1x)** to each well. Cover the microtiter plate with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C.
8. Repeat the aspiration/wash process for five times as in step 6.
9. Add 90µl of **TMB Substrate** to each well. Incubate for 15-30 minutes at 37°C. **Protect from light**.
10. Add 50µl of **Stop Solution** to each well, gently tap the plate to ensure thorough mixing.

11. Determine the optical density of each well within 5 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. Subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

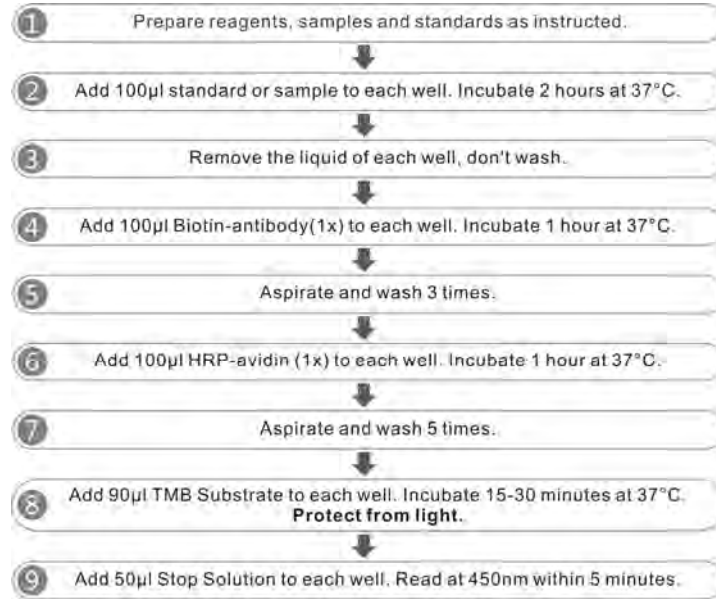
***Samples may require dilution. Please refer to Sample Preparation section.**

Note:

1. The final experimental results will be closely related to validity of the products, operation skills of the end users and the experimental environments.
2. Samples or reagents addition: Please use the freshly prepared Standard. Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall as possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
3. Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed.
4. Washing: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading. When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of wash buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.

5. Controlling of reaction time: Observe the change of color after adding TMB Substrate (e.g. observation once every 10 minutes), TMB Substrate should change from colorless or light blue to gradations of blue. If the color is too deep, add Stop Solution in advance to avoid excessively strong reaction which will result in inaccurate absorbance reading.
6. TMB Substrate is easily contaminated. TMB Substrate should remain colorless or light blue until added to the plate. Please protect it from light.
7. Stop Solution should be added to the plate in the same order as the TMB Substrate. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the TMB Substrate.

ASSAY PROCEDURE SUMMARY



*Samples may require dilution. Please refer to Sample Preparation section.

CALCULATION OF RESULTS

Using the professional soft "Curve Expert 1.3" to make a standard curve is recommended, which can be downloaded from our web.

Average the duplicate readings for each standard and sample and subtract the average zero standard optical density.

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the x-axis against the concentration on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the CD83 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

Human CD83 antigen (CD83) ELISA kit
каталожен номер **MBS924667**

Съхранение: Китът се съхранява при 2-8 ° C

Чувствителност: 1.95 pg/ml.

Детекционен обхват: 7.8 pg/ml-500 pg/ml.

Компаненти на кита:

Плаки (12 x 8 coated Microwells) 1(96 wells)

Стандарти (Freeze dried) 2

Biotin-antibody (100 x concentrate) 1 x 120 µl

HRP-avidin (100 x concentrate) 1 x 120 µl

Biotin-antibody Diluent 1 x 10 ml

HRP-avidin Diluent 1 x 10 ml

Разредител на проби 1 x 20 ml

Миеш буфер (25 x concentrate) 1 x 20 ml

ТМВ себстрат 1 x 10 ml

Стопиращ разтвор 1 x 10 ml

Адхезивни стрипове (For 96 wells) 4

Инструкции за употреба - 1

Подготовка на пробите:

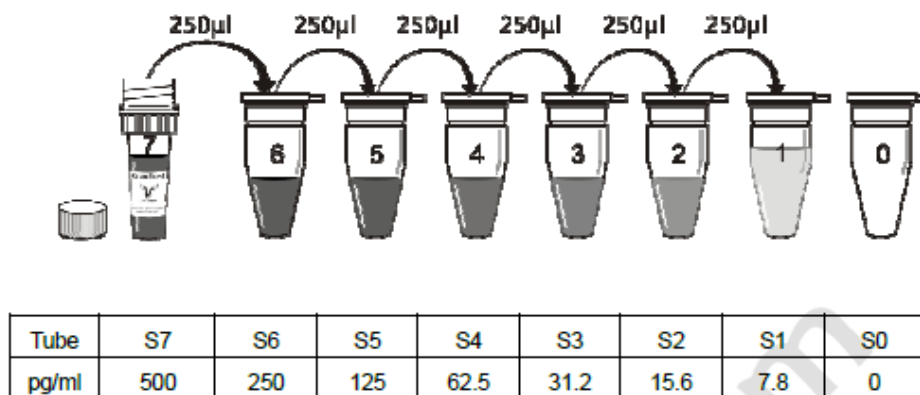
Серумните и плазмени проби изискват 10-кратно разреждане в разредител за проби. Предложеният 10-кратно разреждане може да се постигне чрез добавяне на 25 µl проба 225µl проба разредител. Препоръчва се фактор на разреждане е само за справка. Факторът за оптимално разреждане трябва да се определя от потребителите в съответствие с техните конкретни експерименти.

Подготовка на стандартите:

Центрофугирайте стандартнат флакона - 6000-10000 rpm.

Разтворете стандартно с 1,0 мл разредител за проби. Не заменяйте други разредители. Това разтваряне произвежда изходен разтвор от 500 пг / мл. Смесете стандарт да се осигури пълно разтваряне и може стандартът да седи в продължение на минимум 15 минути с леко разклащане преди вземане разреждания. Прехвърля се с пипета 250 мкл Sample разредител във всяка епруветка (S0-S6). Използвайте разтвора на склад за производство на серия

разреждане на два пъти (по-долу). Всяка епруветка се размесва добре преди следващото прехвърляне. The неразреден стандарт служи за висок стандарт (500 пг / мл). Проба разреждател служи като нулев стандарт (0 пг / мл).



Работен протокол:

- 1 Подготовка на всички реактиви, работни стандарти, и проби, както е указано в предишните раздели.
2. Вижте Състав Layout лист за да се определи броя на кладенци да бъдат използвани и сложи всички останали кладенци и десикант обратно в торбичката и запечатай найлонови, магазин неизползваните кладенците при 4 ° C.
3. Добавете 100 µl на стандарт и проба на ямка. Покрийте с лента адхезив. Инкубирайте в продължение на 2 часа при 37 ° C. Една чиния изложи се предоставят за записване на стандартите и пробите се анализират.
- 4 Отстранете течността от всяка ямка, не си мият.
5. Добавете 100 µl биотин-антитяло (1x) към всяка ямка. Покрийте с нова самозалепваща лента. Инкубирайте за 1 час при 37 ° C. (Биотин-антитела (1x) може да изглежда мътна. Се затопли до стайна температура и се разбърква внимателно, докато се появи решение униформа.)
- 6 Аспирирайте и промийте всяка ямка, като процесът се повтаря два пъти за общо три измивания. Измийте чрез попълване на всяко гнездо с Wash Buffer (200 µl) с помощта на бутилка келеш, мулти-канален пипета колектор опаковка, или autowasher, и го оставете да престои в продължение на 2 минути, пълно отстраняване на течност при всяка стъпка е от съществено значение за доброто представяне. След последното измиване, извадете всички останали буфер за

промиване чрез аспириране ordecanting. Обърнете плочата и да го залича срещу чисти хартиени кърпи.

7. Добавете 100 μ l на HRP-авидин (1x) към всяка ямка. Покрийте ямките с нова самозалепваща лента. Инкубирайте за 1 час при 37 ° C.

8 се повтаря процеса на пълнене / измиване за пет пъти в стъпка 6.

9 Добави 90 μ l на TMB субстрат към всяка ямка. Инкубирайте в продължение на 15-30 минути при 37 ° C. Да се пази от светлина.

10 Добавяне на 50 μ l на Stop Solution във всяко гнездо, леко потупайте плаката да се осигури пълно смесване.

11 Определете оптичната плътност на всяка ямка в рамките на 5 минути, с помощта на четец за микроплаки настроен на 450 Nm. Ако корекция на дължината на вълната е на разположение, настроен на 540 Nm или 570 Nm. Изваждане четения на 540 Nm или 570 Nm от показанията при 450 nm. Това изваждане ще коригира за оптични дефекти в плаката. Четения направени директно при 450 nm без корекция може да бъдат по-високи и по-малко точни.



Product Information Sheet

Product Name:	Gelatin, FITC-conjugated
Catalog Number:	85145
Size:	5 mg
Fluorescence:	Excitation/Emission wavelength= 495 nm/520 nm.
Storage:	Gelatin, FITC conjugate, is supplied as lyophilized powder. It is stable for at least 1 year when stored desiccated at -20°C.
Product description:	<p>Gelatin is denatured collagen composed of heterogeneous mixture of water-soluble proteins of high average molecular weights. Below 35-40°C gelatin swells and absorbs 5-10 times its weight of water to form a gel. Gel strength and viscosity gradually weaken upon prolonged heating in solution above 40°C.</p> <p>This product is extracted from porcine skin, and then heavily labeled with FITC. The stock solution can be prepared by dissolving the product in 10 mM acetic acid with heating to 50°C to facilitate dissolution.</p> <p>For gelatinolytic assays¹, dilute the stock solution in appropriate assay buffer, pH >7.0. Then incubate the FITC-gelatin with proteases at 37°C for 16-24 hr. Centrifuge the sample at 10,000 x g for 10 min. The protease activity is demonstrated by the increment of fluorescence in the supernatant at Ex/Em=495 nm/520 nm.</p> <p>For <i>in vitro</i> research use only</p>

References

1. K. Otsuka et al., *J.Nihon Univ Sch Dent.* 39, 182-190 (1997).

Лого на AnaSpec

Информационен лист на продукта

Наименование на продукта:	Желатин, конюгиран с FITC
Каталожен №:	85145
Обем:	5 mg
Флуоресценция:	Дължена на вълната при Възбуждане/Излъчване = 495 nm/520 nm.
Съхранение:	Желатин, конюгиран с FITC, се предоставя като лиофилизирана прах. Тя е стабилна за най-малко 1 год. когато е съхранявана в десикатор при -20°C.
Описание на продукта: За желатинолитичен анализ, разрежете конц. разтвор в подходящ буфер за анализ, pH >7.0. Тогава инкубирайте FITC-желатин с протеазите при 37°C за 16-24 часа. Центрофугирайте пробата при 10,000 x g за 10 min. Протеазната активност се демонстрира чрез отделяне на флуоресценция в супернатантата при Ex/Em=495 nm/520 nm. За ин витро изследователски цели



Product Information Sheet

Product Name:	MMP-2 enzyme, Human
Catalog Number:	72005
Size:	1 µg
Concentration:	10 µg/mL
Activity (Unit/µg):	Provided on the label
Unit definition:	One unit of protease hydrolyzes 1 picomole of Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH ₂ (AnaSpec Cat#27077) per minute at pH 7.4 at 25° C.
Storage:	Store at -80°C. Avoid multiple thaw-freeze cycles.

Instruction:

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a family of secreted or membrane-associated zinc endopeptidases capable of digesting extracellular matrix components.^{1,2} MMP-2 (72-kDa gelatinase-A) is involved in tumor development and metastasis.³⁻⁵ It is proposed as a therapeutic target for cancer.

Recombinant human MMP-2 was expressed as a pro-enzyme with His-tag in CHO cells. Pro-MMP-2 can be fully activated by incubating with 1 mM APMA at 37°C for 20 min to 1 hr.⁶ Its activity can be measured in FRET-based enzymatic assays (AnaSpec Cat#71129, Cat#71151). 10-20 ng of enzyme is sufficient for FRET-based assay.

MMP-2 is stored in 50mM Tris-HCl at pH 7.5, 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂, 1uM ZnCl₂, 0.05% Brij35 and 1mg/ml BSA.

References

1. Woessner, J. et al. *J. Biol. Chem.* 263, 16918 (1988).
2. Woessner, J. et al. *FASEB. J.* 5, 2145 (1991).
3. Collier, I. et al. *J. Biol. Chem.* 263, 6579 (1988).
4. Salo, T. et al. *J. Biol. Chem.* 258, 3058 (1983).
5. Salo, T. et al. *J. Biol. Chem.* 260, 8526 (1985).
6. Murphy, G. et al. *J. Biol. Chem.* 269, 6632 (1994).

Лого на AnaSpec

Информационен лист на продукта

Наименование на продукта:	MMP-2 ензим, човешки
Каталожен №:	72005
Обем:	1 µg
Концентрация:	10 µg /mL
Активност (Ед./µg):	Отбелязано на етикета
Определяне на единиците::	Една единица протеаза хидролизира 1 пикомол от Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH ₂ (AnaSpec Cat#27077) за минута при pH 7.4 при 25° C.
Съхранение:	Съхранявайте при -80°C. Избягвайте повторно замразяване и размразяване
Описание на продукта: MMP-2 е съхраняван в 50mM Tris-HCl при pH 7.5, 0.2M NaCl, 5mM CaCl ₂ , 1µM ZnCl ₂ , 0.05% Brij35 и 1mg/ml BSA.



Product Information Sheet

Product Name:	Human MMP-9 (Recombinant, Catalytic Domain)
Catalog Number:	55576-10
Lot Number:	See label on the vial
Amount/size:	10 µg
Activity:	>100 Units/µg (Exact value is supplied with Certificate of Analysis)
Activity Definition:	One unit of MMP-9 hydrolyzes 1 picomole of QXL™ 520-γ-Abu-Pro-Cha-Abu-Smc-His-Ala-Dab (5-FAM)-Ala-Lys-NH ₂ (AnaSpec Cat# 60581) per minute at pH 7.5 at 25° C. Supplied enzyme does not require pre-activation.
Source:	The sequence (Accession # NP_004985.2) corresponding to the catalytic domain (aa 112-445) of Human MMP-9 along with 6-his tag was expressed in <i>E. coli</i> . The recombinant human MMP-9 was purified from bacterial lysate and refolded using proprietary technique. The molecular weight of the recombinant Human MMP-9 Catalytic Domain is ~40 kDa.
Purity:	Greater than 95% as determined by SDS-PAGE.
Endotoxin (EU/µg):	Less than 1 EU per 1 µg of the protein as determined by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) quantitative kinetic assay.
Storage:	The purified Human MMP-9 is supplied as sterile and frozen at 40 µg /ml in the following buffer: 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl ₂ , 20 µM ZnCl ₂ , pH=7.5. Store at -80 °C for up to 6 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Instructions:

Matrix metalloproteinases (MMPs) belong to a family of secreted or membrane-associated zinc endopeptidases capable of digesting extracellular matrix components (1,2). MMP-9 (92-kDa gelatinase, collagenase-IV) is involved in a number of diseases such as cancer, angiogenesis, alopecia, and metastasis (3,4). MMP-9 is secreted as zymogen with prodomain, gelatin-binding domain consisting of three contiguous fibronectin type II units, catalytic domain, proline-rich linker region, and C-terminal hemopexin-like domain. It can degrade a variety of substrates, including gelatin, collagens type IV, V, XIV, α₂-macroglobulin, elastin, vitronectin, and proteoglycans (1-4).

Figure 1.

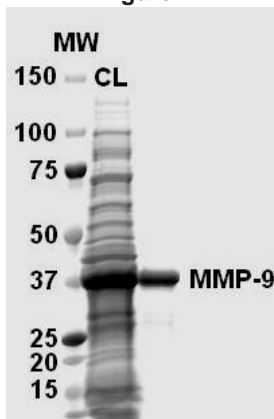


Figure 1. Recombinant Human MMP-9 (Catalytic Domain) on SDS-PAGE

The purified MMP-9 was loaded onto 4-15% Tris-HCl poly-acrylamide gel at 2 µg/well and resolved at 200V for 60 minutes.

Legend:

MW is Molecular Weight Markers in kilo Daltons,
CL is cell lysate of induced *E. coli*,
purified MMP-9.

References:

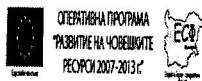
1. J. F. Woessner et al., *J.Biol.Chem.* 263 (1988), 16918-16925
2. J. F. Woessner, Jr., *FASEB J.* 5 (1991), 2145-2154
3. S. M. Wilhelm et al., *J.Biol.Chem.* 264 (1989), 17213-17221
4. A. J. Fosang et al., *Biochem.J.* 295 (1993), 273-276

For Research Use Only.

Лого на AnaSpec

Информационен лист на продукта

Наименование на продукта:	Човешки MMP-9 (Рекомбинантен, каталитичен домен)
Каталожен №:	55576-10
Обем:	10 µg
Концентрация:	10 µg /mL
Активност (Ед./µg):	>100 единици/g
Определяне на единиците::	Една единица MMP-9 хидролизира 1 пикомол от QXL™ 520-γ-Abu-Pro-Cha-Abu-Smc-His-Ala-Dab (5- FAM)-Ala-Lys-NH2 (AnaSpec Cat# 60581) за минута при pH 7.5 при 25° C. Предоставения ензим не изисква предварителна активация
Източник	Секвенцията (Accession # NP_004985.2) кореспондираща към каталитичния домен (AK 112-445) на човешки MMP-9 заедно с 6-his tag е експресирана в <i>E. coli</i> . Рекомбинантният човешки MMP-9 е пречистен от бактериалния лизат и поставена, използвайки патентована технология. Молекулната маса на рекомбинантния човешки MMP-9 Каталитичен домен е ~40 kDa.
Чистота	Повече от 95% както е определено чрез SDS-PAGE.
Endotoxin (EU/µg):	По-малко от 1 EU на 1 µg от протеина, както е определено чрез Limulus Amebocyte Lysate (LAL) количествен кинетичен анализ.
Съхранение:	Съхранявайте при -80°C. Избягвайте повторно замразяване и размразяване
Описание на продукта:



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ
НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ“



BG051PO001-3

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ.

Бенефициент:

Институт по биология и имунология на размножаването "Акад. Кирил Братанов"

Образец № 4

ДО ИБИР – БАН
бул. „Цариградско шосе“ № 73
гр. София

ЦЕНОВА ОФЕРТА

За участие в открита процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет:
«Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции»

ЗА ОБОСОБЕНА ПОЗИЦИЯ № и име/

Обособена позиция № 21 – Колориметрични и хемилуминисцентни тестове, съвместими за работа с флуоремутър

Fluorostar Optima

Настоящата оферта е подадена от: Ай Ви Ди България ООД/наименование на участника/, ЕИК/БУЛСТАТ200123131.; адрес по регистрация: гр. София, ул. Бела 21А. Адрес за кореспонденция: гр. София 1756, ж.к. Дървеница, бл. 48 В, факс 02/975 80 23.

Заличени данни - чл.37,
ал.1 от ЗЗК - търговска
тайна

Заличени данни - чл.37, ал.1 от
ЗЗК - търговска тайна

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския социален фонд“

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

УВАЖАЕМА ГОСПОЖО ДИРЕКТОР,

1. С настоящето представяме нашата ценова оферта за обособена позиция **Обособена позиция № 21 – Колориметрични и хемилуминисцентни тестове** **съвместими за работа с флуоресцентен аналитичен реактор Fluorostar Optima** (офертата се изготвя за всяка обособена позиция *по отделно*) от поръчката.

Приемаме да изпълним поръчката по посочената обособена позиция, при следните цени:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
№ по ред	Номер от ОП	Наименование	Единица мярка	Количество	Предложение на участника	Единична цена в лева без ДДС, съобразно единицата мярка	Обща цена в лева без ДДС (колона 5 x колона 7)	Каталожен номер/брой в опаковка/производител
	ОП Р-... / ОП К-...	Обособена позиция № 21 – Колориметрични и хемилуминисцентни тестове, съвместими за работа с флуоресцентен аналитичен реактор Fluorostar Optima						
1	ОП Р-21-1	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-2; Ex/Em=490 nm/520 nm;	кит	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1548,00	1548,00	AS-72224/96 tests/ANASPEC
2	ОП Р-21-2	Флуориметричен кит за изолиране и измерване на ензимната активност на MMP-9; Ex/Em=490 nm/520 nm;	кит	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1548,00	1548,00	AS-72017/96 tests/ANASPEC
3	ОП Р-21-3	Флуориметричен кит за измерване ензимната активност на Neprilysin; Ex/Em=490 nm/520 nm;	кит	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1404,00	1404,00	AS-72223/96 tests/ANASPEC
4	ОП Р-21-4	Флуориметричен кит за измерване ензимната активност на ACE2; Ex/Em=330 nm/390 nm;	кит	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1248,00	1248,00	AS-72086/96 tests/ANASPEC

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

5	ОП Р-21-5	ELISA кит за количествено определяне на MMP-2 (матриксна металопроотеиназа-2)	кит	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1165,00	1165,00	KA0391/96 tests/Abnova
6	ОП Р-21-6	ELISA кит за количествено определяне на MMP-9 (матриксна металопроотеиназа-9)	кит	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1165,00	1165,00	BMS2016/2/96 tests/eBioscience
7	ОП Р-21-7	ELISA кит за количествено определяне на CD83	кит		Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	1600,00	1600,00	MBS924667/96 tests/MyBiosorce
8	ОП Р-21-8	Желатин - FITC, разфасовка от 5 mg	опаковка	5	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	321,60	1608,00	AS-85145/5mg/ANAS PEC
9	ОП Р-21-9	Човешки MMP-2 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	опаковка	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	402,00	402,00	AS-72005/10 µg/mL/ANASPEC
10	ОП Р-21-10	Човешки MMP-9 стандарт, 100 µL, 10 µg/mL	опаковка	1	Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция.	966,00	966,00	AS-55576-10/10µg/mL/ANASPEC

Обща цена на обособената позиция, лева без ДДС	12654,00
За участници регистрирани по ЗДДС: ДДС = 20%, лева	2530,8
Обща цена на офертата с ДДС, лева	15184,8

Пояснения:

- Колони 1 – 5 от таблицата се попълват съгласно Техническата Спецификация на Възложителя - Приложение № 1 от документацията за участие – без да се променят !!.
- Колона № 6 „Предложение на участника» може да не се попълва с конкретни технически характеристики, каталожен или партиден номер на артикула и други, а да се напише текст „Съгласно приложената Техническа оферта за съответната обособена позиция”.
- ДДС, в случай, че е дължим от Възложителя, ще се заплаща съгласно разпоредбите на българското законодателство.
- Оценката на офертите се извършва по цени в лева без ДДС. !

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

2. Цените включват стойност на стоките и всички присъщи разходи, данъци и такси за доставка (без ДДС) франко ИБИР-БАН, гр. София, бул. «Цариградско шосе» № 73. Данък добавена стойност (ДДС) се заплаща отделно, съгласно изискванията на българското законодателство.

3. Цените се представят с точност до втория знак след десетичната запетая и не подлежат на промяна за срока на договора, сключен с Възложителя.

4. Условия и начин на плащане: по банков път, в лева по наша банкова сметка както следва:

Заличени данни - чл.37, ал1 от ЗЗК - търговска тайна

при банка

в срок от 5 календарни дни след доставка и представяне на фактура, двустранно подписан приемателно-предавателен протокол и заверено копие на писмена заявка от възложителя.

5. При условие, че бъдем избрани за изпълнител на обществената поръчка, ще представим парична / банкова гаранция за изпълнение на задълженията по договора в размер на 2% от стойността му, без ДДС.

6. Подаването на настоящата ценова оферта удостоверява безусловното приемане от наша страна на всички изисквания и задължения, поставени от Възложителя в провежданата процедура.

! ВАЖНО: Ако участникът подава оферта за повече от една обособена позиция, плик № 3, т.е. Ценова оферта се представя за всяка обособена позиция по отделно в отделен плик № 3 и се надписва по следния начин:

„Име на участника:“

Предлагана цена по обособена позиция №“.

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК - търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Дата 08.08.2014

гр. София

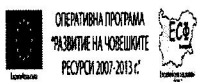
/ подпис, печат/

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Управител
Ай Ви Ди България ООД

BG051PO001-3.3.06 -0059

«Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции»



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”



BG051PO001-3.3.06 -0059

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ
НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ,
СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ
В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ
И ИНОВАЦИОННИ BIOTEKHOЛОГИИ.

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Образец № 8

ДЕКЛАРАЦИЯ

по чл. 56, ал. 1, т. 8 от ЗОП

за използване / не използване на подизпълнители

Долуподписаният Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

в качеството си на Управител (длъжност) на .Ай Ви Ди България ООД

(наименование на участника или на дружество – член на обединение / консорциум - участник в процедурата), ЕИК 200123131, със седалище и адрес на управление гр. София, ул. Бигла 21А - участник в процедура за възлагане на обществена поръчка с предмет: «Доставка на материали /реактиви/ и консумативи по обособени позиции», обявена от ИБИР-БАН в изпълнение на Договор № BG051PO001-3.3.06 -0059

ДЕКЛАРИРАМ, ЧЕ:

Представленият от мен участник в процедурата – Ай Ви Ди България ООД(наименование на участника):

1. при изпълнението на обществената поръчка няма да използва подизпълнители

Известно ми е, че за посочване на неверни данни, нося наказателна отговорност по чл. 313 от Наказателния кодекс.

Забележка: т. 2, 3 и 4 се попълват за всяка обособена позиция поотделно.

Заличен печат - чл.37, ал1 от ЗЗК -
търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

05.08.2014

Декларатор:

(дата на подписване)

Заличени лични данни - чл.2, ал.1 от ЗЗЛД

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд”

Платете на - име на получателя ИБИР БАН		
IBAN на получателя BG26UNCR96603110023912	Вид плащане	
BIC на банката на получателя UNCR9660	При банка - име на банката на получателя УНИКРЕДИТ БУЛБАНК АД	
ПЛАТЕЖНО НАРЕЖДАНЕ (ВНОСНА БЕЛЕЖКА) ЗА ПЛАЩАНЕ КЪМ БЮДЖЕТА	Вид валута BGN	Сума 253.08
Основание за плащане/вносяне - вид данък, такса, осигуровка, мито, лихва...		
ГАРАНЦИЯ ЗА ИЗП. ПО ОП ЗА ИБИР БАН		
Още пояснения 2014 ДОСТ. НА КОНСУМАТИВИ ЛОТ 21		
Вид 9	номер на документа, по който се плаща	Дата на документа
Период, за който се отнася плащането		
От дата:	До дата:	
Задължено лице - наименование на юридическото лице или трите имена на физическото лице IVD BULGARIA OOD		
БУЛСТАТ на задълженото лице 200123131	ЕГНЛНЧ на задълженото лице	
Номер от НДР на задълженото лице		
Наредител - наименование на юридическото лице или трите имена на физическото лице IVD BULGARIA OOD		
IBAN на наредителя	Заличени данни - чл.37, ал. 1 от 33К - търговска тайна	BIC на банката на наредителя
При банка - име на банката на поръчителя	Заличени данни - чл.37, ал. 1 от 33К - търговска тайна	
РИНГС	Заличени данни - чл.37, ал. 1 от 33К - търговска тайна	
Дата на плащане 12.11.2014	РИНГС Дата He	Валюор 12.11.2014
	Бордеро B1411121005499250PBISER/	

Заличен печат - чл.37, ал. 1 от 33К - търговска тайна;
Заличен подпис - чл.2, ал.1 от 33ЛД