

## Rat total MMP-2 ELISA Kit

### 基质金属蛋白酶-2(总) ELISA 试剂盒

产品编号: EK0639

规格: 96T

检测范围: 625pg/ml→40,000pg/ml。

特异性: 系统和其它细胞因子无交叉反应。

敏感性: <10pg/ml

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (较长时间不用时)。

有效期: 4个月(4℃); 8个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析大鼠血清、血浆、细胞裂解液、细胞培养上清。

#### 工作原理

Metalloproteinases, MMPs, 基质金属蛋白酶。是依赖锌和钙的内肽酶, 能够降解细胞外基质的所有成分。它们在许多生理过程中发挥重要作用, 如胚胎发育、组织成型、复制、再生等。它们参与很多病理过程如关节炎、癌症、心血管疾病。新合成 MMPs 的量主要由复制水平控制。MMPs 的活性主要由酶原的活化和其抑制蛋白质 (TIMPs) 所调节。MMP-2 可降解一系列基质如IV, V, VII, X型胶原, 弹性蛋白和纤维连接蛋白。本试剂盒所用标准品为重組大鼠 MMP-2, 662 个氨基酸, 分子量 72KDa。所检测 MMP-2 包括酶原和活性酶。

博士德所提供的大鼠 MMP-2 ELISA Kit 是典型的夹心法酶联免疫吸附测定试剂盒 (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay, ELISA)。预先包被的抗体和检测相抗体都是亲和纯化的多克隆抗体。检测抗体经生物素 (biotin) 标记。样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后, PBS 或 TBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应; 经过 PBS 或 TBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 MMP-2 呈正相关。

#### 试剂盒中内容 (96 孔)

| 内容                        | 规格     | 数量  |
|---------------------------|--------|-----|
| 预包被抗大鼠 MMP-2 抗体的 96 孔板    | 96T    | 1 板 |
| 重组大鼠 MMP-2 冻干标准品          | 40ng/管 | 2 管 |
| 生物素标记抗大鼠 MMP-2(100X)      | 100ul  | 1 管 |
| 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) (100X) | 100ul  | 1 管 |
| 样品稀释液                     | 30ml   | 1 瓶 |
| 抗体稀释液                     | 12ml   | 1 瓶 |
| ABC 稀释液                   | 12ml   | 1 瓶 |
| TMB 显色液                   | 10ml   | 1 瓶 |
| 终止液                       | 10ml   | 1 瓶 |
| 洗涤缓冲液(25X)                | 20ml   | 1 瓶 |
| 封板膜                       |        | 4 张 |



**注意：使用前请检查试剂盒中试剂的标签和数量与表格是否一致  
需要而未提供的试剂和器材**

1. 标准规格酶标仪。
2. 自动洗板机。
3. 恒温箱
4. 系列可调节移液器及吸头，一次检测样品较多时，最好用多通道移液器。
5. 干净的试管和 Eppendorf 管。
6. 用去离子水将 25X 洗涤缓冲液稀释 25 倍，成 1X 洗涤缓冲液。

### 注意事项

1. 使用前 TMB 显色液应为无色透明溶液，若发现颜色异常，请及时与厂家联系。
2. 用户在初次使用试剂盒时，应将各种试剂管离心数分钟，以便试剂集中到管底。
3. 要严格避免操作过程中酶标板干燥。干燥会使酶标板上生物成份迅速失活。
4. 为免交叉污染，要避免重复使用手中的吸头和试管。
5. 禁止混用不同批次试剂盒内的试剂。
6. 本公司提供的 96 孔酶标板是单条可拆型酶标板，用户可按需求使用；剩余的酶标板请按保存条件贮存。
7. 揭封板膜和覆盖封板膜时应避免用力过大导致液体溅出。

### 洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将 1X 洗涤缓冲液至少 300ul 注入孔内，浸泡 1-2 分钟。根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

### 样品的准备和保存

样品如果不立即分析，应分装后冷冻保存，且避免反复冻融。

细胞培养上清——离心去除沉淀，立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血清——用干净试管收集血液，室温凝固 30 分钟，离心 2000×g 20 分钟，收集血清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

血浆——采用肝素抗凝，抽血后 30 分钟内离心 2000×g 20 分钟。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

细胞裂解液——对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水或无血清培养液洗一遍。加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散，用手指轻弹以充分裂解细胞。充分裂解后，10000—14000g 离心 3-5 分钟，取上清。立即分析或分装后-20℃冷冻保存。

### 样品稀释的一般原则

用户须估计样品待测因子的含量，决定适当的稀释倍数，以使稀释后样品中待测因子的浓度处于 ELISA 试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量高、中、低的不同，分别采取不同的

#### 稀释方案:

高——指待测因子在 400-4000ng/ml。按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。  
中——指待测因子在 40-400ng/ml。按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。  
低——指待测因子在 625 -40,000pg/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。  
特低——指待测因子 $\leq$ 625pg/ml。样品一般不做稀释, 或按 1: 2 稀释。  
以上方案仅供参考。样品的稀释应有详细记录。

### 试剂的准备和保存

#### A. MMP-2 标准品的稀释和使用。

试剂盒提供 2 管标准品, 每管 40ng, 每次使用 1 管。

1. 配制 40ng/ml 标准品: 取 1ml 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 10 分钟以上, 然后反复颠倒/搓动以助溶解。
2. 配制 20,000pg/ml $\rightarrow$ 625pg/ml 标准品: 准备 6 只 Eppendorf 管, 每管加 0.3ml 样品稀释液, 分别标记上 20,000pg/ml, 10,000pg/ml, 5000pg/ml, 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml。取 0.3ml 40ng/ml 的标准品加入标记 20000pg/ml 的管中, 混匀后同样取出 0.3ml, 加入下一只管中。余同此类推, 直到最后一只样品管。

**注意:** 已经稀释的标准品 (40ng/ml), 应在 12 小时内使用。-20℃冷冻保存条件下, 2 天内可以使用,但不得反复冻融。

#### B. 生物素标记抗大鼠 MMP-2 抗体工作液的准备: 在使用前 2 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实际配制时应多配制 100-200ul)。
2. 按 1ul 生物素标记抗大鼠 MMP-2 加抗体稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

#### C. 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 工作液的准备: 在使用前 1 小时内准备。

1. 根据每孔需要 100ul 计算总的用量 (实配时应多配制 100-200ul)。
2. 按 1ul 亲和素-过氧化物酶复合物 (ABC) 加 ABC 稀释液 99ul 的比例配制工作液。轻轻混匀。

### 操作程序

已稀释好的 ABC 和 TMB 显色液在加入酶标板孔前都应预先在 37℃中平衡至少 30 分钟。试剂或样品稀释时, **切不可忘记混匀**。每次检测都应该做标准曲线。用户须估计样品待测因子的含量, 决定适当的稀释倍数。

1. 确定本次检测所需的已包被抗体的酶标板孔数目, 并增加 1 孔作为 TMB 空白显色孔。总数=样品数+9; 做双份检测时 $\times$ 2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 40,000pg/ml, 20,000pg/ml, 10,000pg/ml, 5000pg/ml, 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml 的标准品各 100ul 依次加入一排 7 孔中, 1 孔只加样品稀释液的作为零孔。对于大鼠血清、血浆、细胞裂解液、细胞培养上清, 直接加已用样品稀释液稀释的样品 100ul。
3. 酶标板加上封板膜, 37℃反应 90 分钟。
4. 反应后用自动洗板机吸去酶标板内的液体; 或甩去酶标板内液体, 再对着吸水纸拍几

下。不洗。

5. 将准备好的生物素抗大鼠 MMP-2 抗体工作液按每孔 100ul 依次加入。(TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 37℃ 反应 60 分钟。
6. 1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次浸泡 1 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。
7. 将准备好的 ABC 工作液按每孔 100ul 依次加入 (TMB 空白显色孔除外)。酶标板加上封板膜, 37℃ 反应 30 分钟。
8. 1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次, 每次浸泡 1-2 分钟左右 (每孔洗液至少 300ul)。
9. 按每孔 90ul 依次加入已在 37℃ 平衡 30 分钟的 TMB 显色液, 37℃ 避光反应 20-25 分钟 (注意: 显色时间供参考, 因用户实验室条件差异, 最佳显色时间会有所不同。此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度蓝色, 后 3-4 孔差别不明显)。
10. 按每孔 100ul 依次加入终止液, 此时蓝色立转黄色。
11. 用酶标仪在 450nm 测定 O.D.值。

有两种设定空白对照的方案:

(1) 将 TMB 空白显色孔(只加 TMB 显色液和终止液)设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去 TMB 空白显色孔的吸光值后, 在坐标纸上画出曲线, 以吸光值作为纵坐标, 以浓度作为横坐标。

(2) 将零孔设为对照。所有的标准品和样品的吸光值减去零孔的吸光值后, 得到的数据可以直接在坐标纸上画出曲线。

12. 根据样品的吸光值在坐标上找出对应的浓度。用户也可以使用各种应用软件来计算。

应记住由于样品稀释了 N 倍, 其实际浓度应该  $\times N$ 。

### 操作程序总结:

1. 加样品和标准品, 37℃ 反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体, 37℃ 反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC, 37℃ 反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB 37℃ 反应 20-25 分钟。
5. 加入终止液, 读数。

### 典型数据

TMB 37℃ 反应 20 分钟。

(数据供参考, 不同用户最佳显色时间会有所不同)

| 浓度   | 0.0pg/ml | 625pg/ml | 1250pg/ml | 2500pg/ml | 5ng/ml | 10ng/ml | 20ng/ml | 40ng/ml |
|------|----------|----------|-----------|-----------|--------|---------|---------|---------|
| O.D. | 0.028    | 0.116    | 0.168     | 0.307     | 0.663  | 1.143   | 1.696   | 2.246   |

### 参考文献

1. Collier, I.E., Wilhelm, S.M., Eisen, A.Z., Marmer, B.L., Grant, G.A., Seltzer, J.L., Kronberger, A., He, C.S., Bauer, E.A. and Goldberg, G.I. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. J. Biol. Chem. 1988; 263 (14), 6579-6587.
2. Fundyler, O., Khanna, M. and Smoller, B.R. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. Mod. Pathol. 2004; 17 (5), 496-502.
3. Marin-castano ME, Csaky KG, Cousins SW. Nonlethal oxidant injury to human retinal pigment epithelium cells causes cell membrane blebbing but decreased MMP-2 activity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Sep; 46(9):3331-40.