

## Human total MMP-13 ELISA Kit

### 基质金属蛋白酶-13(总) ELISA 试剂盒

产品编号: EK0468

规格: 96T

检测范围: 156pg/ml→10000pg/ml。

特异性: 系统和 hMMP-8,hMMP-12 交叉反应<1%; 和 hMMP-1,hMMP-2, hMMP-3, hMMP-7 交叉反应<0.25%。

敏感性: <5pg/ml

保存: 2-8℃ (频繁使用时); -20℃ (较长时间不用时)。

有效期: 6个月(4℃); 12个月(-20℃)。

用途: 用于体外定量分析人血清、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-13 又称胶原酶 3, 可降解 I, II, III, IV, IX, X, XIV 型胶原和纤维连接蛋白。MMP-13 合成时是一个 452 个氨基酸的酶原, 其 N 端 84 个氨基酸经其它 MMPs 切除而活化, 如 MMP-2, MMP-14。本试剂盒所用标准品为人 MMP-13, 452 个氨基酸, 分子量 52KDa。所检测 MMP-13 包括酶原和活性酶。

博士德所提供的人 MMP-13 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合素反应; 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-13 呈正相关。

#### 试剂盒中内容 (96 孔)

内容	规格	数量
预包被抗人 MMP-13 抗体的 96 孔板	96T	1 板
重组人 MMP-13 冻干标准品	10ng/管	2 管
生物素标记抗人 MMP-13(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 1000×g 15 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 1000×g 15 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 100-1000ng/ml。一般按 1: 100 稀释。297ul 样品稀释液加 3ul 样品。

中——指待测因子在 10-100ng/ml。一般按 1: 10 稀释。225ul 样品稀释液加 25ul 样品。



低——指待测因子在 156–10000pg/ml。按 1: 2 稀释。100ul 样品稀释液加 100ul 样品。

特低——指待测因子≤156pg/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-13 标准品的稀释和使用：**在使用前 2 小时内准备。

试剂盒提供 2 管标准品，每管 10ng，每次使用 1 管。

1. 配制 10ng/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 5000pg/ml→156pg/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 5000pg/ml, 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 312pg/ml, 156pg/ml。取 0.3ml 10ng/ml 的标准品加入标记 5000pg/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（10,000pg/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. 生物素标记抗人 MMP-13 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 生物素标记抗人 MMP-13 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×2。其余重包装好放入冰箱中。
2. 将 10ng/ml, 5000pg/ml, 2500pg/ml, 1250pg/ml, 625pg/ml, 312pg/ml, 156pg/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。对于人血清、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人 MMP-13 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°C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°C 平衡 30 分钟的 TMB 显色液，37°C 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°C 反应 90 分钟。不洗。
2. 加生物素标记抗体，37°C 反应 60 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 3 次。
3. 加 ABC，37°C 反应 30 分钟。1X 洗涤缓冲液洗涤 5 次。
4. TMB 37°C 反应 20-25 分钟。
5. 加入终止液，读数。

### 典型数据

TMB 37°C 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	156pg/ml	312pg/ml	625pg/ml	1250pg/ml	2500pg/ml	5ng/ml	10ng/ml
O.D.	0.108	0.196	0.288	0.463	0.824	1.287	1.794	2.201

### 参考文献

1. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J. Biol. Chem. 1994; 269 (24), 16766-16773.
2. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):21491-4. Review.
3. Fortunato SJ, Menon R, Ahmed NU, Bourgeois M, Dildy GA. Amniotic fluid concentrations of collagenase-1 and collagenase-3 are increased in polyhydramnios. J Perinat Med. 2004;32(2):122-5.