

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: GBQ041

产品规格: 48T(30 samples)/96T(78 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 325 nm, 发射波长 393 nm)

Elabscience®基质金属蛋白酶 3(MMP-3)

荧光法测试盒

Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3) Activity

Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞样本中的基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)的活力。

检测原理

基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)是 MMP 家族的重要成员之一。MMP-3 前体被纤溶酶(plasmin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)等丝氨酸蛋白水解酶(serine protease)剪切去除包含半胱氨酸开关的前体肽, 激活形成具有蛋白酶活性的 MMP-3。MMP-3 能够降解或剪切多种细胞外基质成分、前体蛋白或前体酶等, 能破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障、释放 E-钙粘蛋白(E-cadherin)、促进肿瘤侵袭转移、促进炎症反应, 在肿瘤等的研究中日益受到重视。此外, MMP-3 还参与组织形态发生、损伤修复、炎症反应等一系列生理、病理过程, 在风湿性关节炎、动脉粥样硬化等疾病发生发展过程中发挥重要作用。

本 MMP-3 荧光法试剂盒采用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法检测。MCA 和 Dnp 被连接到 MMP-3 酶的天然底物上的两端, 当 MMP-3 蛋白酶没有切割该底物时, 两个基团足够接近, 发生荧光共振能量转移, 即 Dnp 可淬灭 MCA 的荧光而导致检测不到荧光; 当该底物被 MMP-3 蛋白酶切割后, 多肽的首尾两端分离, 两个基团分开, MCA 的荧光不再被 Dnp 淬灭, 即可检测到 MCA 的荧光, 这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测 MMP-3 蛋白酶的酶活性。MCA 的最大激发波长为 325nm, 最大发射波长为 393nm。

本试剂盒检测组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	7 mL×1 瓶	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	激活剂 (Activator)	0.15 mL×1 支	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	蛋白酶抑制剂 (Proteinase Inhibitor)	0.75 mL×1 支	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	0.1 mL×1 支	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 325 nm，发射波长 393 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液的配制：

按照试剂四：试剂一=1:100的体积比混匀，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，4 h内使用有效。

③ 10 mmol/L标准品的配制：

取一支试剂五加入1.7 mL二甲基亚砜，溶解完全得到10 mmol/L标准品溶液，-20°C避光可保存7天。

④ 100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液的配制：

取10 μL ③中配制的10 mmol/L标准品溶液加入990 μL 双蒸水稀释得到100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液，配好的标准品溶液可2-8°C避光保存1天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	20	30	40	60	80	90	100
100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液(μL)	0	20	30	40	60	80	90	100
双蒸水(μL)	100	80	70	60	40	20	10	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：直接测定

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1: 9匀浆, 4°C 10000 × g离心10 min后取上清待测, 留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞, 加入0.2 mL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆, 4°C 10000 × g离心10 min后取上清待测, 留取部分上清进行蛋白浓度测定。

若需要测定样本中全部的MMP-3酶活, 需要使用激活剂对样本进行激活, 样本的激活步骤如下:

取50 μ L组织/细胞待测上清或血清血浆加入1 μ L试剂二, 混匀, 37°C孵育10 min, 加入10 μ L试剂三混匀, 样本在此处理过程被稀释1.22倍。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.03-9.66 U/L, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	1-2	10%大鼠肺组织	1-2
10%小鼠肝组织	1-2	1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释
大鼠血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释

注: 稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

若样本对照荧光值大于测定荧光值, 可能是样本酶活高, 需要稀释后重新测定。

操作步骤

- ① 标准孔：取 10 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 10 μL 生理盐水加入相应的酶标孔中。
- ② 向①中各标准孔加入 90 μL 试剂一，各测定孔和对照孔加入 90 μL 试剂四工作液。
- ③ 振板 3s，荧光酶标仪设置激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 测定各孔荧光值 F_1 ，标准曲线按照 F_1 绘制。
- ④ 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，荧光酶标仪设置激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 测定各孔荧光值 F_2 。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	10	--	--
待测样本(μL)	--	10	--
生理盐水(μL)	--	--	10
试剂一(μL)	90	--	--
试剂四工作液(μL)	--	90	90
振板 3s，荧光酶标仪设置激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 测定各孔荧光值 F_1 。			
37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，荧光酶标仪设置激发波长 325 nm，发射波长 393 nm 测定各孔荧光值 F_2 。标准曲线按照 F_1 绘制。			

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

血清血浆样本中 MMP-3 酶活力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每升血清(浆)每分钟转化底物生成 1 μmol 产物所需要的 MMP-3 酶量为一个活力单位。

未激活样本:

$$\text{MMP-3 活性 (U/L)} = (\Delta F_{\text{测}} - \Delta F_{\text{对}} - b) \div a \div T \times f$$

激活样本:

$$\text{MMP-3 活性 (U/L)} = (\Delta F_{\text{测}} - \Delta F_{\text{对}} - b) \div a \div T \times f \times 1.22$$

组织和细胞样本中 MMP-3 酶活力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟转化底物生成 1 μmol 产物所需要的 MMP-3 酶量为一个活力单位。

未激活样本:

$$\text{MMP-3 活性 (U/gprot)} = (\Delta F_{\text{测}} - \Delta F_{\text{对}} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times f$$

激活样本:

$$\text{MMP-3 活性 (U/gprot)} = (\Delta F_{\text{测}} - \Delta F_{\text{对}} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times f \times 1.22$$

注解:

y: 标准孔荧光值-空白孔荧光值(标准品浓度为 0 时荧光值。标准曲线按照 F_1 绘制)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta F_{\text{测}}$: 样本测定孔变化荧光值($F_{2\text{测}} - F_{1\text{测}}$)

$\Delta F_{\text{对}}$: 样本对照孔变化荧光值($F_{2\text{对}} - F_{1\text{对}}$)

T: 孵育反应时间, 20 min

C_{pr} : 组织和细胞的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

1.22: 激活样本的固定稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

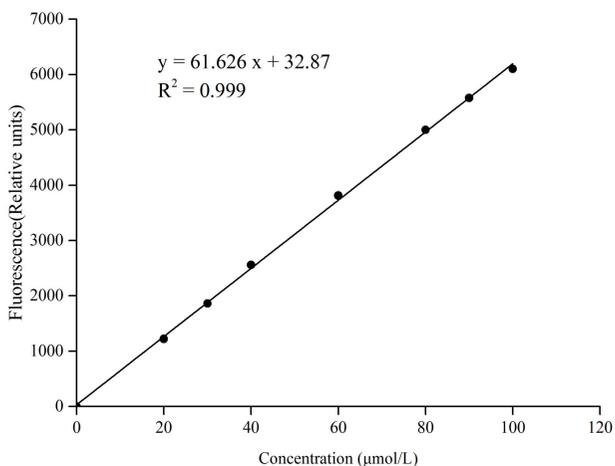
检测范围	0.03-9.66 U/L	批间差	7.5-7.7 %
灵敏度	0.03 U/L	批内差	2.0-4.0 %
加标回收率	92-118 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	20	30	40	60	80	90	100
测定荧光值 F_1	238	1469	2091	2786	3975	5153	5739	6355
	249	1460	2121	2820	4135	5337	5902	6337
平均荧光值	243	1465	2106	2803	4055	5245	5821	6346
绝对荧光值	0	1222	1863	2560	3812	5002	5577	6103

② 绘制标曲(如下图)：



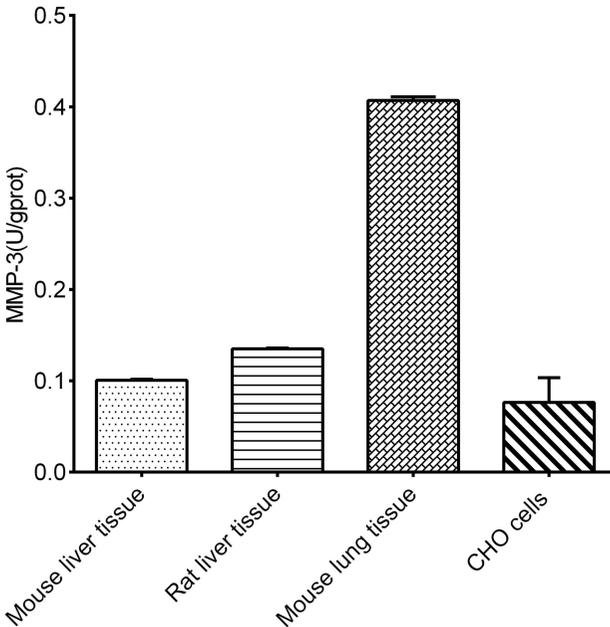
附录 2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

10%的小鼠肝组织样本匀浆按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 61.626x + 32.87$, 样本测定 F_1 值为878, F_2 值为2304, $\Delta F_{测} = 2304 - 878 = 1426$, 对照 F_1 值为700, F_2 值为685, $\Delta F_{对} = 685 - 700 = -15$, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为11.25 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{MMP-3 活性 (U/gprot)} = (1426 - 32.87 + 15) \div 61.626 \div 20 \div 11.25 = 0.10 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为11.25 gprot/L, 加样量为10 μL)、大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为13.73 gprot/L, 加样量为10 μL)、小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度为3.66 gprot/L, 加样量为10 μL)和CHO细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度为1.53 gprot/L, 加样量为10 μL)中MMP-3活力(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

