

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-D003

产品规格: 96T

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 抑制剂筛选试剂盒

Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3)

Inhibitor Screening 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

本试剂盒适用于测定基质金属蛋白酶 3(MMP-3)抑制剂的抑制效果。

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 抑制剂筛选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。

如果在反应体系中加入 MMP-3 蛋白酶的抑制剂(Inhibitor), 荧光的生成会被抑制, 荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比, 这样就可以检测出 MMP-3 蛋白酶抑制剂的抑制效果。MCA 的最大激发波长为 325 nm, 最大发射波长为 393 nm。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	激活剂 (Activator)	0.05 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	稳定剂 (Stabilizer)	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	0.1 mM 伊洛马司他 (0.1 mM GM6001)	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)	0.03 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板	
	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(激发波长为 325 nm，发射波长为 393 nm)，37°C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温，**试剂六置于冰上保存。**

② 试剂四工作液的配制：

按照试剂四：双蒸水按3: 20的体积比混匀，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制，配好的试剂四工作液当天使用有效。

③ 对照工作液的配制：

根据测定样本数预估对照工作液用量，试剂一：试剂二按21: 0.2的体积比混匀，37°C避光孵育10 min后，取出置于冰上待用，现配现用，按需配制，配好的对照工作液2-8°C避光保存可使用2天。

④ 试剂六工作液的配制：

根据测定样本数计算预估工作液用量，试剂六：试剂一：试剂二按1: 20: 0.2的体积比混匀，37°C避光孵育10 min后，取出置于冰上待用，现配现用，按需配制，配好的试剂六工作液2-8°C避光保存可使用2天。

⑤ **GM6001的使用：使用双蒸水稀释到所需浓度。**

注：本试剂盒提供 GM6001 为 MMP-3 广谱抑制剂，仅作为阳性参考使用，在本试剂盒中的 IC50 约为 100 nM，实测数据会有差异。

样本准备

建议使用双蒸水稀释样本，若样本水溶性较差，可使用DMSO配制成高浓度溶液后，使用双蒸水稀释，反应体系中DMSO含量应小于5%。

实验关键点

① 使用移液枪加入试剂时建议吸二打一，避免产生气泡。

② 试剂四和试剂六体积较小，使用前离心。

操作步骤

- ① 总酶活孔：取 10 μL 试剂六工作液，加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 10 μL 试剂六工作液，加入相应的酶标孔中。
阳性对照孔：取 10 μL 试剂六工作液，加入相应的酶标孔中。
空白对照孔：取 10 μL 对照工作液，加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 90 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②中各孔加入 10 μL 试剂三，振板 3 s，室温静置 3 min。
- ④ 向步骤③中总酶活孔和空白对照孔加入 10 μL 双蒸水，测定孔加入 10 μL 样本，阳性对照孔加入 10 μL GM6001，振板 3 s，室温静置 5 min。
- ⑤ 向步骤④中各孔加入 10 μL 试剂四工作液，振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。
- ⑥ 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。

操作表

	总酶活孔	测定孔	阳性对照孔	空白对照孔
试剂六工作液(μL)	10	10	10	--
对照工作液(μL)	--	--	--	10
试剂一(μL)	90	90	90	90
试剂三(μL)	10	10	10	10
振板 3 s，室温静置 3 min				
双蒸水(μL)	10	--	--	10
样本(μL)	--	10	--	--
GM6001(μL)	--	--	10	--
振板 3 s，室温静置 5 min				
试剂四工作液(μL)	10	10	10	10
振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 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。				

结果计算

样本抑制率计算公式：

$$\text{抑制率(\%)} = (F_{\text{总}} - F_{\text{测}}) \div (F_{\text{总}} - F_{\text{空}}) \times 100\%$$

注解：

F_总：总酶活孔荧光值

F_测：测定孔荧光值

F_空：空白对照孔荧光值

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。

