

小鼠Total MMP-9双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE10106

规格: 96T

灵敏度: 0.01 ng/mL

检测范围: 0.156-10 ng/mL

用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中的小鼠Total MMP-9浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

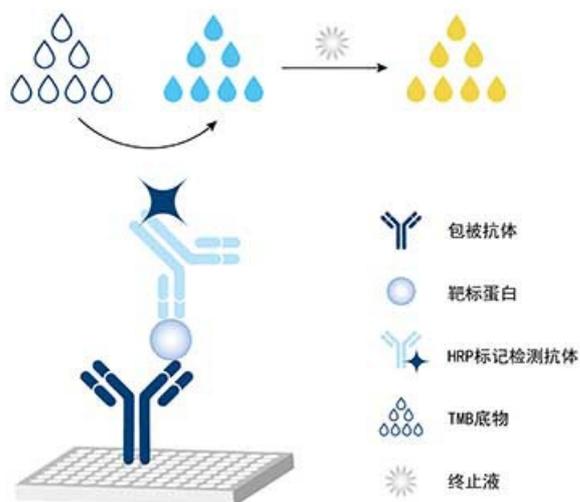
目录

一：背景信息	3
二：检测原理	3
三：需自备的实验器材	3
四：试剂盒组分及储存	4
五：实验注意事项	4
六：样本准备	4
七：试剂准备	5
八：实验步骤	6
九：实验参数	7
9.1 参考标曲图	7
9.2 精密度	7
9.3 加标回收率	7
9.4 样本值	8
9.5 灵敏度	8
9.6 线性	8
9.7 特异性	9
十：参考文献	9

一：背景信息

MMP9（基质金属蛋白酶9），也称为明胶酶B，是基质金属蛋白酶（MMP）家族的成员。MMP 酶家族由至关重要的细胞外基质重塑蛋白酶组成，其活性与正常胚胎发生、组织重塑和许多疾病有关，如关节炎、癌症、牙周炎、肾小球肾炎、脑脊髓炎、动脉粥样硬化和组织溃疡。MMP9 由多种正常和转化细胞产生，包括中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、破骨细胞等。转基因小鼠模型报告中，MMP9 有助于皮肤癌发生，抑制实验性腹主动脉瘤的发展，并在癌发生过程中触发血管生成转换。

二：检测原理



◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	20 ng/瓶	2 瓶
Detection antibody, HRP-conjugated (100×)	HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) **	120 μL/支	1 支
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	2 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	30 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液 (20×)	30 mL/瓶	1 瓶
TMB	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4 张

储存条件：

- 1: 未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年
- 2: 已开启试剂盒可在2-8°C存放7天
- 3: 每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

** 开盖前请离心

五：实验注意事项

- 5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；
- 5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；
- 5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；
- 5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

六：样本准备

- 6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。
- 6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。
- 6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液 (1×)：

如果洗涤液 (20×) 有晶体析出, 37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释: 如取30 mL 浓缩洗涤液 (20×), 加入570 mL 超纯水或去离子水, 得到洗涤液 (1×)。

7.2 HRP标记检测抗体 (1×)：

开盖前瞬时离心, 按1:100比例进行稀释, 稀释前根据预先计算实验所需的总量配制 (100 μL/孔), 实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) 加 990 μL 抗体稀释液进行配制, 轻轻混匀。

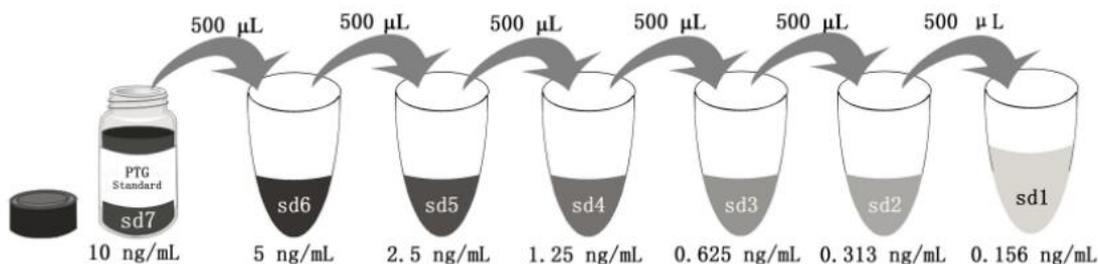
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释, 如果样本检测值超过标曲最高范围, 可将样本进行一定的稀释后再进行实验, 使样本的检测值处于标曲范围内, 不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下: 小鼠血清和血浆样本1:50或1:100稀释; 细胞上清样本1:64或1:128稀释。

7.4 梯度稀释的标准品：

用2 mL PT 4B1样本稀释液复溶标准品, 具体操作如下:



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 4B1	2000 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100 μL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2) 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 μL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100 μL HRP标记检测抗体（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100 μL，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.8 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.9 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm 波长读数；

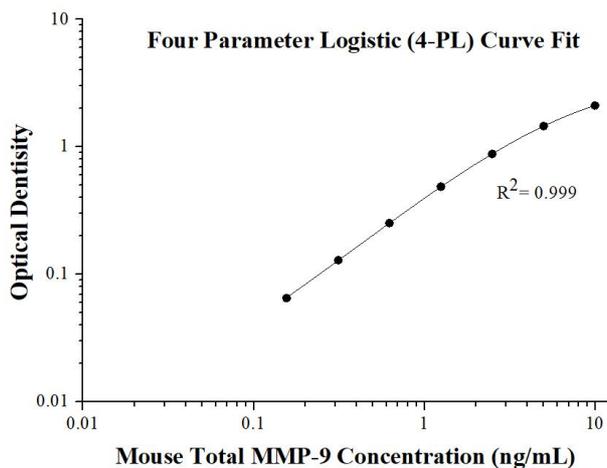
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

操作流程如下：

步骤	试剂	体积	孵育时间	洗涤次数	孵育温度
1	标准品或样本	100 μL	120 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
2	HRP标记检测抗体（1×）	100 μL	40 分钟	4 次	覆膜后37°C孵育
3	显色 TMB	100 μL	15-20 分钟	不需要洗涤	覆膜后37°C孵育，避光
4	终止液	100 μL	0 分钟	不需要洗涤	-
5	加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟				

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(ng/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0003 0.0030	0.0017	-
0.156	0.0636 0.0701	0.0669	0.0652
0.313	0.1295 0.1323	0.1309	0.1292
0.625	0.2486 0.2604	0.2545	0.2528
1.25	0.4889 0.4885	0.4887	0.4870
2.5	0.8764 0.8903	0.8834	0.8817
5	1.4611 1.4583	1.4598	1.4581
10	2.0983 2.1365	2.1174	2.1157

9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	20	4.95	0.26	5.27
2	20	1.15	0.04	3.33
3	20	0.30	0.01	4.88

板间精密度 (CV间)				
样本	数量	平均值 (ng/mL)	标准差	变异系数CV%
1	24	4.95	0.19	3.90
2	24	1.14	0.04	3.54
3	24	0.32	0.01	4.02

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行小鼠Total MMP-9的加标回收率实验，结果如下：

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
小鼠血清	1:200	89	82-98
	1:400	84	80-88
细胞上清	1:256	95	82-113
	1:512	93	85-101

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清中小鼠Total MMP-9的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
小鼠血清 (n=16)	117.52	46.86-240.93

细胞上清 - 在含有 10% 胎牛血清、50 μ M β -巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和100 μ g/mL 硫酸链霉素的 RPMI 培养基中培养小鼠肺组织（100 mL 培养基中 1-2 mm 大小的 3 个肺片）。收集细胞上清检测小鼠Total MMP-9含量，检测浓度为 255.04 ng/mL。

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中小鼠Total MMP-9的灵敏度为0.01 ng/mL。

9.6 线性

小鼠血清和细胞上清用样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

(小鼠血清样本预先稀释25倍，细胞上清样本预先稀释32倍。)

		小鼠血清	细胞上清
1:2	均值 (%)	100	100
	范围 (%)	-	-
1:4	均值 (%)	97	102
	范围 (%)	84-106	97-110
1:8	均值 (%)	103	102
	范围 (%)	97-111	93-114
1:16	均值 (%)	100	103
	范围 (%)	85-112	95-116

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠Total MMP-9，加入50 ng/mL以下细胞因子，无明显交叉反应。

Human:	Mouse:
MMP-1	Lipocalin-2/NGAL
MMP-2	MMP-2
MMP-3	
MMP-7	
MMP-8	

十：参考文献

1. Roy R , Yang J , Moses M A . Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(31):5287-5297.
2. Nagase H . Matrix metalloproteinases - a mini-review[J]. *Contributions to Nephrology*, 1994, 107:85.
3. Stamenkovic I . Extracellular Matrix Remodelling: The Role of Matrix Metalloproteinases[J]. *The Journal of Pathology*, 2003, 200(4):448-464.
4. Pytliak M , Viola Vargová, Viola Mechírová. Matrix Metalloproteinases and Their Role in Oncogenesis: A Review[J]. *Onkologie*, 2012, 35(1-2):49-53.
5. Asli T . Relationship Between MMP-1, MMP-9, TIMP-1, IL-6 and Risk Factors, Clinical Presentation, Extent and Severity of Atherosclerotic Coronary Artery Disease[J]. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 2011, 5(1):110-116.
6. Coussens L M , Tinkle C L , Hanahan D , et al. MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis[J]. *Cell*, 2000, 103(3):481-490.
7. Pyo R , Lee J K, Shipley J M, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105(11):1641-9.
8. Bergers G . Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2.