

## 胶原蛋白酶2,9检测试剂盒 (MMP Zymography assay kit) P1700

**描述:** 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)以无活性的酶原形式分泌,活化后能降解细胞外基质的胶原蛋白,又称胶原酶。胶原酶通过影响细胞外基质参与胚胎发育、形态发生、组织重塑等过程,并参与炎症、肿瘤、心血管、神经等许多疾病过程。血浆和组织中的MMP-2、MMP-9参与各种生理与病理过程,其在临床诊断和治疗中的意义日益受到重视<sup>1</sup>。

本试剂盒采用酶谱法(zymography)检测MMP-2、MMP-9活性。Zymography是一种广为使用的、基于SDS-PAGE电泳和反相凝胶染色的蛋白酶检测方法,其灵敏度可达**1 nM**,高于ELISA方法<sup>2</sup>,其基本原理和程序是:制备加有胶原酶底物的SDS-PAGE凝胶,含蛋白酶的样品在此凝胶中进行电泳,电泳结束后取出凝胶与酶反应Buffer孵育,凝胶染色与脱色。凝胶中由于含底物蛋白而被深染,形成深色背景,但在有蛋白酶条带的位置,蛋白酶降解凝胶中的底物蛋白,因而不被染色而形成透亮区域,从而能同时指示MMP-2、MMP-9的大小位置(酶谱)及活性。本试剂盒提供MMP-2、MMP-9特异蛋白底物及酶学反应缓冲液,可检测少至0.1~0.5  $\mu$ l血液中的MMP-2、MMP-9酶谱及活性,检测灵敏度约为1 nM。试剂盒可进行50次标准小胶检测,如果小胶加样孔为10~15个,则总计可检测500~750个样品。

参考文献:

1. Nagase H and Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*, 1999, 274, 21491-21494
2. Heussen C, and Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem*, 1980, 102, 196-202

**适用:** 检测MMP-2、MMP-9酶谱及活性

**组成与储存 (50 assays):** 12个月有效

1. 2  $\times$  SDS-PAGE non-reducing buffer 1.5 ml, -20  $^{\circ}$ C 储存
2. 10  $\times$  Substrate G 50 ml -20  $^{\circ}$ C 储存
3. 10  $\times$  Buffer A 50 ml 4  $^{\circ}$ C 储存 使用时用蒸馏水稀释
4. 10  $\times$  Buffer B 50 ml 4  $^{\circ}$ C 储存 使用时用蒸馏水稀释
5. SDS-PAGE凝胶蛋白质考马斯亮蓝染色液(货号P1501) 4  $^{\circ}$ C储存

**操作步骤:**

1. 制备含MMP底物蛋白的SDS-PAGE凝胶: 推荐分离胶浓度为8%。按照标准程序制备SDS-PAGE凝胶。将10  $\times$  substrate G 融化, 90  $^{\circ}$ C加热5分钟, 分别在浓缩胶和分离胶中额外加入10  $\times$  substrate G 并使之稀释10倍, 混匀后加入过硫酸铵和TEMED, 等待凝胶聚合。
2. 待测样品1:1稀释于2  $\times$  SDS-PAGE non-reducing buffer (用完后可自行配制: 4% SDS, 100 mM Tris-Cl pH6.8, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue), 混合后直接上样。**切勿加热变性, 并且仅使用不加还原剂的上样缓冲液。**可通过预试验确定加样量, 使用普通蛋白预染Marker即可。阳性对照(可选步骤): 可取人、小鼠、大鼠或兔100 $\mu$ l全血与100 $\mu$ l 2  $\times$  SDS-PAGE non-reducing buffer等体积混合, 取5-15 $\mu$ l上样。
3. 低电流恒流电泳, 每一块小胶电流为20 mA。溴酚蓝跑出凝胶前沿时结束电泳。
4. 洗涤凝胶: 取出凝胶, 去除浓缩胶, 放入容器内。可先用适量蒸馏水冲洗凝胶, 然后加入10 ml 1 $\times$  Buffer A(用蒸馏水稀释), 室温漂洗凝胶2  $\times$  18小时, 中间换液。

5. 孵育: 倒掉Buffer A。加入10 ml 1× Buffer B(蒸馏水稀释), 室温或37°C孵育1~5小时。阳性对照或者血中的MMP通常37°C孵育1小时即可显示。如MMP活性低, 应延长孵育时间为10小时或过夜。
6. 显色: 倒掉Buffer B, 加入SDS-PAGE凝胶蛋白质考马斯亮蓝染色液(操作步骤见SDS-PAGE凝胶蛋白质考马斯亮蓝染色液说明书)。凝胶的大部分区域被深染, 在有MMP条带的位置不被染色而形成透亮区域。透明区域的位置和范围指示MMP-2、MMP-9的大小位置(酶谱)及活性。阳性对照将在66~72 (MMP-2)、92 (MMP-9)、130 (proMMP-9)、225 (proMMP-9) kDa位置出现透明条带。
7. 条带扫描: 将凝胶放在扫描仪上扫描。虽然MMP条带透明, 但凝胶背景并非真正全黑。解决办法: 可用非透射光扫描, 或用软件图像处理程序调整背景显示为灰度显示, 并尽量设置为黑色。MMP条带则为白色, 这种背景黑条带白的格式是英文论文中最常见的格式。

## 说明

1. 10 mM能够 EDTA完全抑制MMP活性。
  2. 凝胶干燥: 可使用聚丙烯酰胺凝胶干胶装置(货号P2000)室温快速干燥凝胶, 作为永久记录保留。
- 1、Zi Y, Zhao W, Zhou J, et al. Silencing of TMSG1 enhances metastasis capacity by targeting V-ATPase in breast cancer[J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2015, 8(2): 1312.
  - 2、Zhang L, Liu C, Meng X, et al. Smad2 protects against TGF- $\beta$ 1/Smad3-mediated collagen synthesis in human hepatic stellate cells during hepatic fibrosis[J]. Molecular and cellular biochemistry, 2015: 1-12.
  - 3、Wang S H, Zhou J D, He Q Y, et al. MiR-199a inhibits the ability of proliferation and migration by regulating CD44-Ezrin signaling in cutaneous squamous cell carcinoma cells[J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2014, 7(10): 7131.
  - 4、Wang H, Zhu Y, Zhao M, et al. miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin  $\beta$ 1 and matrix metalloproteinase2 (MMP2)[J]. PloS one, 2013, 8(8): e70192.
  - 5、Zhao Y, Yao R, Ouyang L, et al. Three-dimensional printing of HeLa cells for cervical tumor model in vitro[J]. Biofabrication, 2014, 6(3): 035001.
  - 6、Wu Y, Wang Y P, Guo P, et al. A lipoxin A4 analog ameliorates blood-brain barrier dysfunction and reduces MMP-9 expression in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2012, 46(3): 483-491.
  - 7、Li J, Fan R, Zhao S, et al. Reactive oxygen species released from hypoxic hepatocytes regulates MMP-2 expression in hepatic stellate cells[J]. International journal of molecular sciences, 2011, 12(4): 2434-2447.
  - 8、Lin Y, Chang G, Wang J, et al. NHE1 mediates MDA-MB-231 cells invasion through the regulation of MT1-MMP[J]. Experimental cell research, 2011, 317(14): 2031-2040.
  - 9、Zhang Y, Huang L, Wang C, et al. Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (Danio rerio) through activation of MMP-9[J]. Chemosphere, 2013, 93(6): 1168-1175.
  - 10、Lei F Y, Zhou T B, Qin Y H, et al. Potential signal pathway of all-trans retinoic acid for MMP-2 and MMP-9 expression in injury podocyte induced by adriamycin[J]. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2014, 34(5): 378-385.
  - 11、Deng L, Li G, Li R, et al. Rho-kinase inhibitor, fasudil, suppresses glioblastoma cell line progression in vitro and in vivo[J]. Cancer biology & therapy, 2010, 9(11): 875-884.
  - 12、Ma S, Yang D, Wang K, et al. Cryptotanshinone attenuates isoprenaline-induced cardiac fibrosis in mice associated with upregulation and activation of matrix metalloproteinase-2[J]. Molecular medicine reports, 2012, 6(1): 145-150.
  - 13、Zhu G, Kang L, Wei Q, et al. Expression and regulation of MMP1, MMP3, and MMP9 in the chicken ovary in response to gonadotropins, sex hormones, and TGFB1[J]. Biology of reproduction, 2014: biolreprod. 113.114249.

## SDS-PAGE 凝胶蛋白质考马斯亮蓝染色液说明书 P1501

常规考马斯亮蓝 SDS-PAGE 凝胶蛋白质染色是实验室常用的凝胶染色方法。银染方法虽然灵敏度高，但所需试剂复杂并且有毒有害，操作步骤繁琐，难以控制获得好的染色效果。

#### 染色步骤:

1. 此染色液即为工作液，使用时直接将聚丙烯酰胺凝胶放在培养皿中以考马斯亮蓝染色液覆盖凝胶，并缓慢摇动 2h；
2. 倾去染色液，用脱色液冲洗凝胶；
3. 以脱色液覆盖凝胶，缓慢摇动 2h，倾去脱色液，再加入新脱色液进行脱色，直至出现透亮区域，此透亮区域为 MMP 条带的位置。（通常此过程需要 2~4h，也可脱色过夜至出现清晰透亮条带和干净背景）；
4. 对凝胶进行分析和照相，凝胶可放置在 7% 的乙酸中保存。也可用凝胶干胶装置（货号 P2000）对凝胶进行处理后保存。

**安全性:** 含有甲醇，无特殊毒性，按一般化学品操作规程处理。

#### 说明:

1. 染色液配方: 0.25g 考马斯亮蓝 R<sub>250</sub>+420ml 甲醇+100ml 冰乙酸, 定容至 1000ml, 混合 1h 后用 Whatman 1 号滤纸过滤, 室温可无限期保存;
2. 脱色液配方: 冰醋酸:甲醇:水=7:5:88 (V:V:V);
3. 保存液: 7%冰醋酸;
4. 凝胶染色之后, 染色液可以回收利用, 装入新容器内, 室温或 4 °C 保存, 可反复使用 2-4 次。