



RTD6143

Ver. 740464

明胶酶谱分析试剂盒 Gelatin Zymography Analysis Kit

产品编号及规格:

货号	名称	规格
RTD6143	明胶酶谱分析试剂盒	50次

贮存、运输及效期:

按照标签温度贮存; 试剂盒常温和湿冰运输; 有效期一年。

产品组成:

货号	名称	规格	贮存
RTD6143-01	4%浓缩胶聚合溶液A (2×)	40 ml	4 °C
RTD6143-02	4%红色浓缩胶溶液B (2×)	40 ml	4 °C
RTD6143-03	10%分离胶聚合溶液A(2.5×)	100 ml	4 °C
RTD6143-04	10%分离胶溶液B (2×)	125 ml	4 °C
RTD6143-05	10×明胶底物	30 ml	RT 配制后-20°C
RTD6143-06	10×复性缓冲液	250 ml	4 °C
RTD6143-07	10×孵育缓冲液	500 ml	4 °C
RTD6143-08	胶原酶阳性对照	0.5 ml	-20 °C
PL112-01	5×蛋白上样缓冲液 (变性,非还原)	1 ml	-20 °C
AP020P	10% APS (干粉)	5 ml	RT 配制后-20°C
TA0761-01	TEMED	0.5 ml	4°C避光
RTD6202-02	FastBlue蛋白染色液	500 ml	RT
TG120P	5×Tris-甘氨酸-SDS电泳缓冲液(干粉)	1 L	RT

产品简介:

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是一种锌依赖性酶, 能切割细胞外基质成分, 能在一定条件下水解明胶。细胞内的MMP以无活性的酶原形式分泌, 活化后能够降解细胞外基质的胶原蛋白, 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。血浆与组织中的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。

本试剂盒采用酶谱法 (Zymography) 检测MMP-2、MMP-9 活性, 其基本原理和程序是: 制备含有胶原酶底物明胶的SDS-PAGE 凝胶, 含蛋白酶的样品在此凝胶中进行电泳, 电泳时, SDS与样本中的MMP可逆性结合, 导致MMP氢键和疏水键被破坏而不能发挥分解明胶的作用。电泳结束后取出凝胶与孵育溶液孵育, MMP恢复活性, 在其迁移位置水解凝胶中的明胶, 考马斯亮蓝染色后凝胶中由于含明胶而被深染形成深色背景, 但在有蛋白酶条带的位置, 蛋白酶将降解凝胶中的底物蛋白, 因而不被染色而形成透亮白色区域, 从而能同时指示MMP-2、MMP-9 的大小位置 (酶谱) 及活性, 其条带亮度强弱与MMP活性成正比。

本试剂盒提供明胶酶谱分析的全套试剂, 试剂盒可进行50 次标准胶(8×10 cm)检测。如果小胶加样孔为10-15个, 则总计可检测500-750个样品。试剂盒配有胶原酶阳性对照, 可以有效分解明胶, 方便判断凝胶及电泳体系是否有问题。

特别提示: 由于MMP活性需要二价阳离子, 蛋白样品提取中避免使用EDTA、EGTA等二价阳离子螯合剂以及还原剂如巯基乙醇和DTT等。蛋白样品提取可以选择RIPA裂解液(强, 不含抑制剂, 不含螯合剂)(货号: RL0120F)。

使用说明:

- 10% APS配制-5 ml:
将APS干粉溶于5 ml灭菌水中, 彻底溶解后分装, -20°C 备存, 每次取一管使用。10% APS应尽量减少常温存放时间, 以防失效。10%APS在4°C 有效期为一周, -20°C 有效期一年。若发现凝胶聚合时间延长, 应考虑更换使用-20°C 保存的10%APS。
- 10×明胶底物配制:
明胶粉末中加入30 ml灭菌水, 60°C 水浴中彻底融化, 冷却至常温后使用。明胶底物配制后-20°C 贮存。

- 一. 分离胶制备:**
- 1.1 参照凝胶模具说明书, 装配好凝胶模具。
 - 1.2 按照表格将不同体积的成分在小烧杯中混合; 最后加入10%APS和TEMED, 轻轻搅拌使其混匀, 避免产生气泡。

1.0 mm厚度凝胶		10%分离胶 4%浓缩胶	
加入顺序	组份	5 ml	1.6 ml
1	10%分离胶聚合溶液A(2.5×)	2 ml	-
2	10%分离胶溶液B (2×)	2.5 ml	-
3	10×明胶底物	0.5 ml	-
4	4%浓缩胶聚合溶液A (2×)	-	0.8 ml
5	4%红色浓缩胶溶液B (2×)	-	0.8 ml
6	10% APS	50 μl	16 μl
7	TEMED	5 μl	1.6 μl

1.3 在玻璃板中灌入适量分离胶溶液（凝胶液加至约距短玻璃板顶端1.5 cm即可），然后在分离胶溶液上轻轻覆盖一层无水乙醇，使凝胶表面保持平整。

1.4 静置10-30分钟，待分离胶和乙醇层之间出现清晰界面后，说明凝胶已聚合。

注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。分离胶25℃约20分钟可以聚合。

二. 浓缩胶配制：

2.1 去除覆盖在分离胶上的乙醇层，用滤纸吸尽残余乙醇。

2.2 按照表格将不同体积成分在一个小烧杯中混合；最后加入10%APS和TEMED，轻轻搅拌使其混匀，避免产生气泡。

2.3 将浓缩胶溶液加至分离胶的上面，直至凝胶溶液到达短玻璃板的顶端。

2.4 将梳子插入凝胶内，避免产生气泡。

2.5 静置30-60分钟，等待浓缩胶聚合。

注：凝胶的聚合时间与环境温度有关。夏天温度较高时，聚合较快；冬天气温低时，聚合时间会延长。浓缩胶25℃约40分钟可以聚合。

三. 电泳：

3.1 5×Tris-甘氨酸-SDS电泳缓冲液的配制：

将一包干粉全部倒入烧杯中，加入约900 ml水彻底溶解，用水定容至1 L（此溶液不用调节pH值，pH 8.3-8.5）。电泳前将缓冲液稀释5倍即配成1×Tris-甘氨酸-SDS电泳缓冲液。

3.2 样品处理：融化-混合-上样

3.2.1 将5×蛋白上样缓冲液（变性，非还原）常温融化后混匀。

3.2.2 将上样缓冲液与蛋白样品按照1:4的比例混匀。

3.2.3 快速离心收集到管底，常温放置5-10分钟，不要加热。

胶原酶阳性对照同时上样5-10 μl（胶原酶阳性对照中胶原酶浓度为20 ng/μl）。

3.3 电泳：

在电泳槽的内槽加入1×电泳缓冲液，轻轻拔出梳子，冲洗加样孔，随后在电泳槽外槽加入适量的1×电泳缓冲液。上样，恒电压150 V电泳。

注：为保证实验效果，内槽缓冲液每次都要使用新鲜配制的电泳缓冲液。外槽缓冲液可以重复使用1-2次。

3.4 电泳条件：

电泳条件（一板胶）				
电压	起始电流	结束电流	时间	可选
150 V	30-40 mA	8-15 mA	50+ min	冰浴电泳

四. MMP检测：

4.1 漂洗：

取出凝胶，放入容器内，加入适量蒸馏水漂洗凝胶，摇床慢摇5分钟，重复一次。

4.2 复性：

4.2.1 1×复性缓冲液配制：

将10×复性缓冲液用蒸馏水稀释10倍，如10 ml 10×复性缓冲液加90 ml蒸馏水。

注：如10×复性缓冲液由于低温贮存有析出时，37℃彻底溶化后再使用。

4.2.2 复性：

取出凝胶，弃蒸馏水，加入50 ml 1×复性缓冲液，摇床慢摇30分钟。注：复性结束后，凝胶呈乳白半透明状。

4.3 孵育：

4.3.1 1×孵育缓冲液配制：

将10×孵育缓冲液用蒸馏水稀释10倍，如10 ml 10×孵育缓冲液加90 ml蒸馏水。

4.3.2 第一次孵育：

倒掉1×复性缓冲液，加入50 ml 1×孵育缓冲液，37℃摇床慢摇10分钟；

4.3.3 第二次孵育：弃1×孵育缓冲液，加入50 ml 1×孵育缓冲液，37℃摇床慢摇4小时-过夜孵育。

注：阳性对照-胶原酶IV通常37℃孵育3-4小时即可消化凝胶中的明胶。如样品中MMP活性低，应延长孵育时间至过夜。

4.4 显色：

4.4.1 漂洗：倒掉孵育缓冲液，凝胶中加入适量蒸馏水，摇床慢摇5分钟，重复漂洗一次。

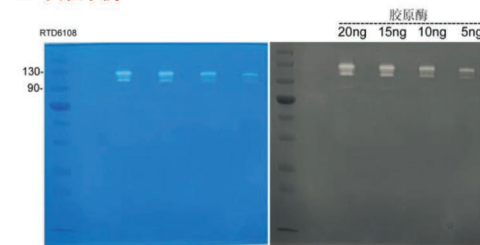
4.4.2 染色：弃蒸馏水，加入适量FastBlue染色液（以刚刚覆盖过胶面为适），摇床上常温摇动30分钟-2小时，凝胶大部分区域被深染，在有MMP条带的位置不被染色而形成透亮区域。

4.4.2 脱色：蒸馏水漂洗2-3次，每次5-10分钟。

4.5 拍照：

由于染色后凝胶背景为蓝色，自然光下拍照效果不好。建议使用凝胶观察透射灯（货号：RT3820）底部打光拍照。

五. 实验示例：



10%分离胶（含明胶底物）

电泳条件：1×TGS 150V 36-12 mA 90 min

实验步骤：

漂洗：蒸馏水漂洗两次；

复性：50 ml 1×复性缓冲液常温复性30分钟；

孵育：50 ml 1×孵育缓冲液37度孵育10分钟；

50 ml 1×孵育缓冲液37度孵育15小时；

漂洗：蒸馏水漂洗两次，每次5分钟；

染色：FastBlue染色60分钟。

脱色：蒸馏水漂洗两次，每次5分钟；

实验结果：胶原酶消化明胶底物，在70-130 kD区间产生明亮条带。

注：此结果非MMP活性结果，但可以验证实验体系及操作是否正确。