

# 明胶酶谱分析试剂盒

## Gelatin Zymography Analysis Kit

Ver.710278

货号	名称	规格
RTD6143	明胶酶谱分析试剂盒	50 次

### ● 产品组成:

货号	名称	规格	保存
RTD6143-01	4%浓缩胶聚合溶液 A (2×)	40 ml	4℃
RTD6143-02	4%彩色浓缩胶溶液 B (2×)	40 ml	4℃
RTD6143-03	10%分离胶聚合溶液 A (2.5×)	100 ml	4℃
RTD6143-04	10%分离胶溶液 B (2×)	125 ml	4℃
RTD6143-05	10×明胶底物	30 ml	RT (配制后-20℃)
RTD6143-06	10×复性缓冲液	250 ml	4℃
RTD6143-07	10×孵育缓冲液	500 ml	4℃
RTD6143-08	胶原酶阳性对照	0.5 ml	-20℃
RTD6202	FastBlue 蛋白染色液	500 ml	RT
PL112	5×蛋白上样缓冲液 (变性, 非还原)	1 ml	-20℃
TG120P	5×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液(干粉)	1 L	RT
AP020P	APS (干粉)	0.5 g	RT (配制后-20℃)
TA0761	TEMED	0.5 ml	4℃, 避光
	说明书	一份	

### ● 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, 其强弱与 MMP 活性呈正比。

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。试剂盒配套有胶原酶阳性对照，可以有效分解明胶，方便判断凝胶及电泳体系是否有问题。

## ● 贮存及运输：

按照试剂盒标签贮存；常温运输；开封后试剂盒有效期一年。

## ● 使用说明：

### 1. 10% APS 配制-5 ml:

将 0.5 g APS 干粉溶于 5 ml 灭菌水中，彻底溶解后分装，1 ml/支，-20℃ 备存，每次取一管使用。10% APS 应尽量减少室温存放时间，以防失效。10%APS 在 4℃ 有效期为一周，-20℃ 有效期 6 个月。若发现凝胶聚合时间延长，应考虑更换使用-20 度保存的 10%APS。

### 2. 10×明胶底物配制：

明胶粉末加入 30 ml 灭菌水，60℃ 水浴中彻底融化，冷却至常温后使用。明胶底物配制后 -20℃ 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。

		10%分离胶	4%浓缩胶
		5 ml	1.6 ml
加入顺序	组份	1.0 mm 厚度凝胶	
1	10%分离胶聚合溶液 A (2.5×)	2.0 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%彩色浓缩胶溶液 B (2×)	-	0.8 ml
6	10% APS	50 μl	16 μl
7	TEMED	5 μl	1.6 μl

1.3 在凝胶模具中灌入适量分离胶溶液（对于 mini-gel，凝胶液加至约距前玻璃板顶端 1.5 cm 或距梳齿约 0.5 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 5-10 分钟，待分离胶和乙醇层之间出现一个清晰的界面后，说明凝胶已聚合

#### 二 浓缩胶制备：

2.1 去除覆盖在分离胶上的乙醇层。

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%过硫酸铵和 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，直至凝胶溶液到达前玻璃板的顶端。

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（25℃ 标准凝固时间为 50 分钟）。

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。可以根据表格标准条件调节催化剂的加入量。

#### 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 1L 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。

注: 由于 MMP 活性需要二价阳离子, 蛋白样品中避免使用 EDTA、EGTA 等二价阳离子螯和剂以及巯基乙醇和 DTT 等。

3.2.3 快甩离心收集到管底, 常温放置 5-10 分钟, 不要加热处理样品, 上样电泳。

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, 轻轻拨出梳子, 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。

#### 电泳条件 (一板胶)

恒电压	起始电流	终止电流	电泳时间	可选
150V	30-40mA	8-15mA	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 50 ml 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 孵育:

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

弃 1×孵育缓冲液, 加入 50 ml 1×孵育缓冲, 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:

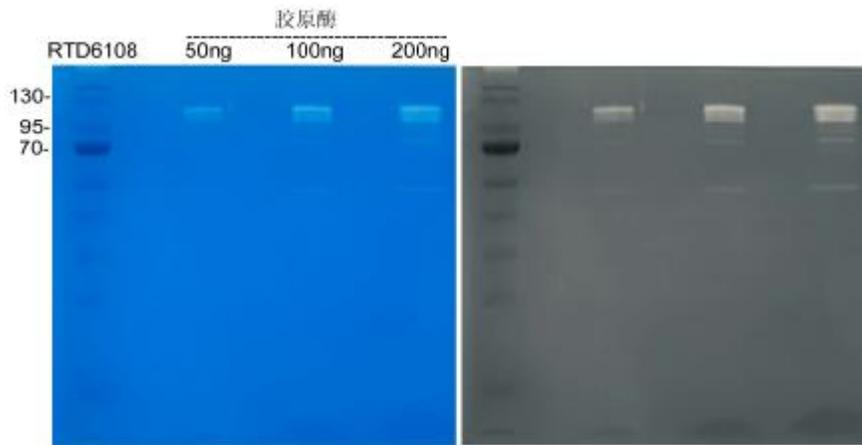
4.4.1 漂洗: 倒掉孵育液, 凝胶中加入 50 ml 蒸馏水, 摇床慢摇 5 分钟, 重复一次。

4.4.2 弃蒸馏水, 加入 50 ml 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; 蒸馏水漂洗 2-3 次, 每次 5-10 分钟。

### 4.5 拍照:

由于考马斯亮蓝染色，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。

漂洗：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 55-130 kD 区间产生明亮条带。