Human Total MMP-1ELISA Kit
检测试剂盒（酶联免疫吸附法）说明书

【货号】EK1403 - 48、EK1403 - 96

【包装规格】 48T、 96

【预期用途】定量检测血清、血浆和细胞培养上清中的人总金属蛋白酶-1(Total MMP-1)浓度。

【背景介绍】

基质金属蛋白酶（matrixmetalloproteinase，MMPs），是一类锌依赖性内肽酶，可降解细胞外基质（ECM）的各种蛋白质组分。MMPs因其需要Ca2+、Zn2+等金属离子作为辅助因子而得名。MMPs家族已分离鉴别出26个成员，编号分别为MMP1～26。根据作用底物以及片断同源性，将MMPs分为6类，为胶原酶、明胶酶、基质降解素、基质溶解素、furin活化的MMP和其他分泌型MMP。MMPs由促炎细胞和子宫胎盘细胞分泌，包括成纤维细胞、成骨细胞、内皮细胞、血管平滑肌、巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和细胞滋养细胞等。MMPs促进细胞增殖、迁移和分化，并在血管生成、细胞凋亡和组织修复中发挥作用。它们影响内皮细胞功能以及血管平滑肌细胞的迁移、增殖、Ca2+信号传导、收缩。MMPs还可以影响细胞表面的生物活性分子，调节各种细胞和信号通路。

【检测原理】

本试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术。特异性捕获抗体预包被在高亲和力的酶标板上。酶标板孔中加入标准品、待测样本和生物素化的检测抗体，经过孵育，样本中存在的待测物质与捕获抗体和检测抗体结合。洗涤去除未结合的物质后，加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(Streptavidin-HRP)。洗涤后，加入显色底物（TMB），避光显色。颜色反应的深浅与样本中待测物质的浓度成正比。加入终止液终止反应，在450nm波长(参考波长570-630nm)测定吸光度值。

【产品组成】

组分	编号	EK1403 - 48	EK1403 - 96
酶标板	EK1403P	48T	96T
标准品	EK1403S	1 vial	2 vials
检测抗体	EK1403D	1 vial	1 vial
标准品稀释液	E0260	5 ml	5 ml
链霉亲和素	E0290	1 vial	1 vial
10×检测缓冲液	E0310	10 ml	10 ml
显色底物	E0230	6 ml	11 ml
终止液	E0300	11 ml	11 ml
20×洗液	E0281	50 ml	50 ml
封板膜	E0200	6	6

注：不同批号试剂盒中的组分不可以互换使用。如上述组分有任何损坏或遗失，请致电400-6721-600与我们的客服部门联系。未经授权或同意，我们不接受无理由的退货。

完成实验需要但未提供的：

1) 能够检测450nm吸光度的酶标仪，参考波长570nm或630nm，涡旋振荡器、微孔板振荡器

2) 移液器及枪头、加样槽；试剂用的试管、离心管、量筒等；

3) 蒸馏水或去离子水；

【储存条件及有效期】

2-8℃保存，失效日期参见试剂盒标签；

开封后试剂盒：预包被酶标板2～8℃大约可贮存 1 个月（未使用的板条请放回铝箔袋，封好封口）；标准品-20℃大约可贮存 1 个月（重溶使用1次后丢弃）；其它组分在 2～8℃大约可以贮存 1 个月。

【样本处理】

1) **细胞培养上清**：300 × g 离心 10 分钟去除沉淀物，即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

2) **血清样本**：离心管收集血清。血样凝集 30 分钟后，1,000 × g 离心 10 分钟。吸取血清样本之后即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

3) **血浆样本**：EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝收集血浆样本。1,000 × g 离心30分钟收集样本。即刻检测，或者分装，-20℃以下贮存。

注意：本试剂盒可能适用于其它生物学样本。细胞培养上清、血清和血浆已经过验证。

检测前，样本中可见的沉淀必须去除。不要使用严重溶血或高血脂的样本。样本应分装并贮存于-20℃，以避免待测物质 活性的丢失。如果在 24 小时内检测，样本可以存放在 2～8℃。

避免样本的反复冻融。在检测前，冷冻样本应缓慢地恢复至室温（25℃±3℃），轻柔地混匀。

【检测前准备】

1) **试剂准备**：检测前请将所有的试剂、样本恢复至室温（25℃±3℃），如果浓缩的试剂出现结晶，37℃温浴，直至结晶全部溶解。显色底物在添加之前应是无色的，请保持显色底物始终处于避光态。

"1×洗液"配制：吸取20×洗液50ml至1L的量筒，加蒸馏水至1,000ml，轻轻混匀，避免泡沫。转移至干净瓶内。2-8℃贮存，1×洗液可稳定保存30天。

"1×检测缓冲液"配制：吸取10×检测缓冲液5ml至100ml量筒，加蒸馏水至50ml，轻轻混匀，避免泡沫。2-8℃贮存，1×检测缓冲液可稳定保存30天。

"检测抗体工作液"配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1：100**稀释检测抗体。

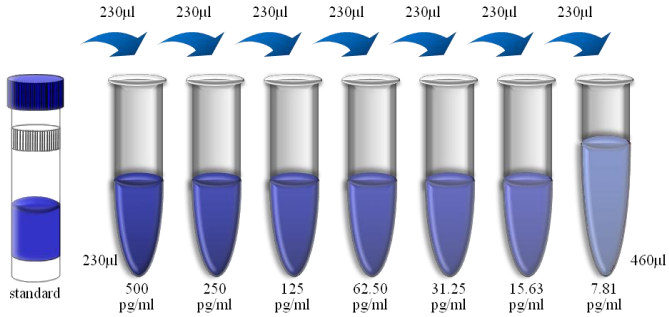
"链霉亲和素工作液"配制：稀释前充分混匀。根据标准品和待检样本的数量，用1×检测缓冲液按**1：100**稀释链霉亲和素。

注意：检测抗体工作液、链霉亲和素工作液均应在 30 分钟内使用。

2) **样本稀释**：为了保证实验成功，由于对样本的处理方式，培养条件等不同，建议首次使用本试剂盒前先进行一次预实验以摸索最佳的样本浓度，避免因浓度过高使显色反应超出酶标仪的检测上限或稀释倍数过大低于试剂盒灵敏度。 对于样本的稀释，请用1×检测缓冲液稀释血清/血浆样本，用细胞培养基稀释细胞培养上清。

3) **标准曲线的制备**：开盖前短暂离心，用蒸馏水在聚丙烯管内重溶标准品，重溶体积标注于标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡，确保充分混匀，重溶后标准品的浓度为1,000 pg/ml。重溶后静置 10 - 30 分钟。稀释前充分混匀。

- 血清/血浆样本标准曲线的制备：取230μl 重溶后的标准品，加入 230μl 标准品稀释液，作为标准曲线的最高浓度 (500 pg/ml)。在每一个试管中加入 230μl 标准品稀释液。使用高浓度标准品做 1：1 系列稀释。每次移液时，请确保充分混匀。以标准品稀释液作为标准曲线的零浓度。
- 细胞培养上清样本标准曲线的制备：取230μl重溶后的标准品，加入230μl标准品稀释液，作为标准曲线的最高浓度(500 pg/ml)。在每一个试管中加入230μl 细胞培养基。使用高浓度标准品做 1：1 系列稀释。每次移液时，确保充分混匀。以细胞培养基作为标准曲线的零浓度。



注：如若标准品发生部分潮解，此为运输保存温度变化所致，并不影响组分的使用。标准品稀释液中可能会观察到蛋白沉淀，该沉淀不影响使用，可以忽略。或者可通过 6,000 × g 离心 5 分钟去除沉淀。

【检测方法】

1) 将不需要的板条拆卸下来，放回装有干燥剂的铝箔袋，重新封好封口。**在任何情况下，避免接触微孔板的内表面。**

2) 每个酶标板上待用的孔加入300μl 1×洗液静置浸泡30秒。弃掉洗液之后，在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后，请立即使用微孔板，不要让微孔板干燥。

3) 加标准品：标准品孔加入100μl 2倍倍比稀释的标准品。空白孔加入100μl标准品稀释液(血清/血浆样本)或培养基(细胞培养上清样本)。

4) 加样本：**血清/血浆**：样本孔加入90μl样本稀释液+10μl样本。**细胞培养上清**：样本孔加入100μl细胞培养上清。(样本稀释请参考第6页“样本准备”)

5) 加检测抗体：每个待测孔加入50μl检测抗体工作液(**1:100**稀释)。

6) 应保证标准品、样本和检测抗体的加样在15分钟内完成，是连续的，不能间断。

7) 孵育：使用封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育2小时。**孵育时均应封好封板膜。**

8) 洗涤：弃掉液体，每孔加入300μl洗液洗板，洗涤6次。每次洗板，在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能，必须彻底移除残留液体。

9) 加酶：每孔加入100μl链霉亲和素工作液(**1:100**稀释)。

10) 孵育：使用新的封板膜封板。100-300转/分钟振荡（保证每孔溶液不撒出且能充分混匀即可），室温（25℃±3℃）孵育45分钟。

11) 重复步骤8）。

12) 加底物显色：每孔加入100μl显色底物，避光，室温（25℃±3℃）孵育5-30分钟。

13) 加终止液：每孔加入100μl终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀，说明终止液与显色底物没有充分混匀，请轻轻叩击板框，充分混匀。**终止液的添加顺序应与显色底物的添加顺序相同。**

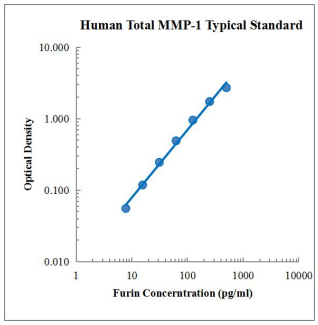
14) 检测读数：在30分钟之内，使用酶标仪进行双波长检测，测定450nm最大吸收波长和570nm或630nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450nm的测定值减去570nm或630nm的测定值。仅使用450nm测定会导致OD值偏高，并且准确度降低。

【标准曲线示例】

每次检测，每块酶标板都必须设立标准曲线。下面的标准曲线仅作为示例参考。

【技术要点】

pg/ml	O.D.		Average	Corrected
0.00	0.065	0.065	0.065	
7.81	0.123	0.118	0.121	0.056
15.63	0.185	0.181	0.183	0.118
31.25	0.315	0.305	0.310	0.245
62.50	0.565	0.546	0.556	0.491
125.00	1.017	1.023	1.020	0.955
250.00	1.805	1.793	1.799	1.734
500.00	2.792	2.761	2.777	2.712



双抗夹心法 ELISA 试剂盒如何控制标曲显色？

5 - 30 分钟显色时间为经验范围，每个具体的实验，可根据以下情况，确定大致的显色时间：

1) 肉眼观察：标曲 S5 孔有淡蓝色、Blank 孔无明显蓝色时，即可终止；

2) 仪器判断：630 nm 左右波长下，标曲 S1 孔的 OD 值达到 0.5 - 0.7、S5 孔的 OD 值达到 0.05 - 0.08、Blank 孔的 OD 值小于 0.05 时，即可终止；

3) 高敏系列试剂盒因灵敏度更高，需严格控制显色时长，可较普通试剂盒适当缩短显色时间。

【局限性】

1) 任何标准品稀释、操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育温度、试剂盒保存时间的改变，都将影响结合反应。

2) 本试剂盒在设计上去除或降低了生物学样本中的一些内源性干扰因素，并非所有可能的影响因素都已经去除。

【注意事项】

1) 本试剂盒用于科学研究，不能用于诊断治疗。

2) 所有的样本和试剂理被认为具有潜在危害。实验时佩戴乳胶或一次性手套等防护措施。避免试剂直接接触皮肤和眼睛。如不慎接触，请立即用大量清水清洗。

3) 只有经过良好实验室培训的工作人员方可使用本试剂盒，请严格按照本说明书操作。

4) 为避免微生物的污染，以及试剂与样本间的交叉污染，请使用一次性枪头，不同的试剂，使用不同的枪头和加样槽；使用干净的容器配制试剂。

5) 请不要使用其他批号或其他来源的试剂替代本试剂盒中的试剂；请不要使用过期的试剂；在试剂盒的贮存或孵育过程请避免强光照射。

6) 显色底物避免与氧化试剂和金属接触；暴露于酸性环境会抑制结合。

7) 避免气溶胶的产生。

8) 液体废弃物的处理。不含酸的液体废弃物，加入 1.0 %的次氯酸钠，浸泡 30 分钟。含酸的液体废弃物，请先中和，再加入次氯酸钠。

9) 在应用自动洗板机时，加入洗液之后，设置 30 秒的浸泡程序，或者在不同的洗涤步骤将微孔板掉转 180 度，这样可以提高分析的准确度。

10) 推荐所有的检测样本和标准品在检测中设复孔。

【基本信息】

生产厂家：杭州联科生物技术股份有限公司

地址：浙江省杭州市萧山区闻堰街道天马路1688号2号楼301室

技术服务热线：**400-6721-600**

网址：www.liankebio.com