

## 小鼠基质金属蛋白酶 8 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号: **MA1013** 规格: **96 次**

### 产品内容

| 产品组成               | 体积/数量            |
|--------------------|------------------|
| 小鼠 MMP-8 预包被板      | 8 孔条×12 个        |
| 样品稀释液              | 30 mL            |
| 重组小鼠 MMP-8 标准品(冻干) | 2 支(10 ng/支)     |
| 生物素标记小鼠 MMP-8 抗体   | 130 μL(效价 1:100) |
| 抗体稀释液              | 12 mL            |
| 酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素) | 130 μL(效价 1:100) |
| 酶复合物稀释液            | 12 mL            |
| 浓缩洗涤液(25×)         | 30 mL            |
| 显色剂 TMB            | 10 mL            |
| 终止液                | 10 mL            |
| 封板胶纸               | 4 张              |

### 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法,用于检测样品中小鼠 MMP-8 的浓度。小鼠 MMP-8 捕获抗体已经预包被于酶标板上,当加入样品或标准品时,其中的小鼠 MMP-8 会与捕获抗体结合,而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着,再加入生物素标记的小鼠 MMP-8 抗体后,抗小鼠 MMP-8 抗体与小鼠 MMP-8 结合,形成夹心的免疫复合物,其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物,生物素与酶复合物特异性结合,这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来,而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂,若样品中存在小鼠 MMP-8,则会形成免疫复合物,其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质,而后加入终止液,最终产物呈黄色。通过酶标仪检测,读取 450 nm 处的 OD 值,小鼠 MMP-8 浓度与 OD450 值之间呈正比,通过检测标准品绘制标准曲线,对照未知样品中 OD 值,即可计算出样品中小鼠 MMP-8 的浓度。

基质金属蛋白酶 8(Matrix metalloproteinase 8, 缩写 MMP-8) 也被称为中性粒细胞胶原酶,属于基质金属蛋白酶家族。它主要由中性粒细胞产生,能够分解细胞外基质中的胶原蛋白等成分,在组织重塑、炎症反应以及某些疾病(如类风湿性关节炎、牙周病等)的发生发展中可能发挥一定的作用。

### 产品参数:

|      |                        |
|------|------------------------|
| 检测范围 | 0.156 ng/mL~10 ng/mL   |
| 敏感性  | 28 pg/mL               |
| 特异性  | 系统和其它因子无交叉反应           |
| 样本类型 | 小鼠血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清 |



## 使用方法

### (一) 样品制备

1. 根据样品种类选择相应的处理方法:

(1) 细胞上清: 将细胞培养上清液100~500×g离心5min, 去除悬浮物后即可。

(2) 血清样品: 将全血在室温下静置0.5~2h, 待其自然凝固并析出血清后, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血清需置于冰上待用, 请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂;

(3) 血浆样品: 使用EDTA对全血进行抗凝处理后, 混合均匀置于冰上, 离心取黄色上清即可(4℃, 1,000~2,000×g, 10min), 注意请勿吸取沉淀, 制备好的血浆需置于冰上待用;

(4) 组织匀浆/体液: 离心去除沉淀即可。

注意:

①若待测样品无法及时检测, 样品制备完成后, 请分装冻存于-20℃, 避免反复冻融;

②请保证待测样品清澈透明, 检测前如发现样品中有悬浮物, 需通过离心去除;

③为了保证检测结果准确, 请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

### 2. 稀释样品

查阅相关文献, 预估样品中待测因子的含量, 从而确定适当的稀释倍数, 使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同, 分别采取不同的稀释方案:

(1) 待测因子含量在 100~1,000 ng/mL 范围内, 一般按 1:100 稀释, 即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品;

(2) 待测因子含量在 10~100 ng/mL 范围内, 一般按 1:10 稀释, 即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品;

(3) 待测因子含量在 0.156~10 ng/mL 范围内, 一般按 1:2 稀释, 即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品;

(4) 待测因子含量≤0.156 ng/mL, 样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考, 实验中请详细记录样品的稀释方法。

### (二) 检测准备工作

3. 试剂盒自4℃冰箱取出后, 请置于室温平衡20min; 如从-20℃取出, 各组分需彻底融化后再平衡20min; 检测完成后, 剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。

4. 将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。

5. 重组小鼠 MMP-8 标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28℃)

(1) 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搓动以助溶解;

(2) 按下表将 10 ng/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 10 ng/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 ng/mL。)



| 管号 | 稀释液用量( $\mu\text{L}$ ) | 复溶后标准品用量( $\mu\text{L}$ ) | 标准品的最终浓度( $\text{ng/mL}$ ) |
|----|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| A  | 0                      | 1000                      | 10                         |
| B  | 300                    | 300(从A管取出)                | 5                          |
| C  | 300                    | 300(从B管取出)                | 2.5                        |
| D  | 300                    | 300(从C管取出)                | 1.25                       |
| E  | 300                    | 300(从D管取出)                | 0.625                      |
| F  | 300                    | 300(从E管取出)                | 0.312                      |
| G  | 300                    | 300(从F管取出)                | 0.156                      |
| H  | 300                    | 0                         | 0                          |

**注意：**标准品复溶加样后，剩余部分请丢弃。

#### 6. 准备生物素标记小鼠 MMP-8 抗体工作液（需在使用前 1 h 内准备）

（1）按每孔需添加100 $\mu\text{L}$ 抗体工作液，计算其总用量(为弥补操作中的损耗，需多配制100~200 $\mu\text{L}$ )；

（2）按1 $\mu\text{L}$ 生物素标记小鼠 MMP-8 抗体添加99 $\mu\text{L}$ 抗体稀释液的比例配制工作液，轻轻混匀。

#### 7. 准备酶复合物工作液（需在使用前 1 h 内准备）

（1）按每孔需添加 100  $\mu\text{L}$  酶复合物工作液，计算其总用量（为弥补操作中的损耗，需多配制100~200  $\mu\text{L}$ ）；

（2）按 1  $\mu\text{L}$  酶复合物 添加 99  $\mu\text{L}$  酶复合物稀释液 的比例配制工作液，轻轻混匀。

### （三）检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数，取出所需板条放置于框架内，多余的板条请放回铝箔袋密封，保存于4℃或-20℃。

**注意：**

①标准品和样品建议做双复孔检测；

②每次实验均需绘制标准曲线。

9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100 $\mu\text{L}$ /孔)分别加入相应孔中，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育90min。

**注意：**

①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度，若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度，请将样品适当稀释后再进行检测；

②整个加样过程不宜超过10min，否则可能会影响检测结果。

10. 甩去酶标板内液体，无需洗板，将板倒扣在吸水纸上拍干。

11. 加入稀释后的生物素标记小鼠 MMP-8 抗体工作液(100 $\mu\text{L}$ /孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育60min。

12. 洗板5次，每孔1 $\times$ 洗涤液用量为300 $\mu\text{L}$ ，注入与吸出间隔15~30s，洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

**注意：**洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。

13. 加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu\text{L}$ / 孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃避光孵育 30 min；

14. 洗板 5 次，方法同步骤 12；

15. 加入显色剂 TMB(100  $\mu\text{L}$ / 孔 )，用封板胶纸封住反应孔，避光 37℃反应 10~25 min。



注意：

- ① 在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属；
- ② 因实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同，反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。

16. 加入终止液(100 $\mu$ L/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量OD450，同时设定540nm或570nm作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570)；

注意：读取OD值建议在10min内完成。

#### (四) 数据分析

17. 绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线，通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

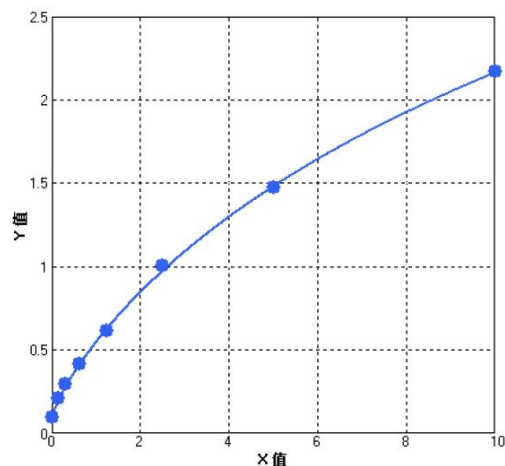
注意：

- ① 复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；
- ② 若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

#### 标准曲线范例

小鼠 MMP-8 参考标准曲线

| 标准品浓度       | O.D.  |
|-------------|-------|
| 0 ng/mL     | 0.093 |
| 0.156 ng/mL | 0.208 |
| 0.312 ng/mL | 0.297 |
| 0.625 ng/mL | 0.413 |
| 1.25 ng/mL  | 0.615 |
| 2.5 ng/mL   | 1.002 |
| 5 ng/mL     | 1.477 |
| 10 ng/mL    | 2.167 |



注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。

#### 保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

#### 注意事项

1. 浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
2. 严禁混用不同批号试剂盒的组分；
3. 加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
4. 说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
6. 本产品仅限科研使用。

S250302

