

# Mouse MMP-9 ELISA Kit

Catalog NO. : RK00187

version: 2.0

\*使用产品前，请务必阅读产品包装内说明书

## **产品简介**

本试剂盒产品使用夹心法定量测定小鼠血清、血浆、细胞培养上清或其它生物体液中 MMP-9 的含量。

## **产品检测原理**

本实验采用双抗夹心 ELISA 法。将抗 MMP-9 抗体预先包被在酶标板上，向微孔中分别加入标准品和样品，样本中 MMP-9 与固相载体上的抗体结合。孵育后，未结合的样品在洗涤过程中会被洗去，加入抗 MMP-9 的检测抗体，形成双抗体夹心。洗去未结合的检测抗体，然后向微孔中加入酶结合物。孵育和洗涤后，加入底物 TMB。样品中 MMP-9 的含量与 TMB 反应的颜色深浅呈正相关，加入酸终止反应并测量吸光值。根据梯度稀释的 MMP-9 标准品的吸光值绘制标准曲线并求出样品的浓度。

## 试剂盒组分及保存条件

未拆封的试剂盒可在 2-8° C 保存 1 年，已拆封的产品须在 1 个月内使用完。

| 组分                                                               | 规格        | 货号      | 拆封后保存条件                                      |
|------------------------------------------------------------------|-----------|---------|----------------------------------------------|
| 抗体预包被酶标板<br>Antibody Coated Plate                                | 8×12      | RM00776 | 将未使用的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，并重新密封，可在 2-8° C 存储 1 个月。 |
| 冻干标准品<br>Standard Lyophilized                                    | 2 支       | RM00773 | 复溶后不建议再次使用。                                  |
| 浓缩生物素化抗体 (100×)<br>Concentrated Biotin Conjugate Antibody (100×) | 1 × 120ul | RM00774 | 可在 2-8° C 存储 1 个月。                           |
| 浓缩链霉亲和素-HRP (100x)<br>Streptavidin-HRP Concentrated (100×)       | 1 × 120ul | RM00775 | 可在 2-8° C 存储 1 个月。                           |

|                                                             |           |         |                    |
|-------------------------------------------------------------|-----------|---------|--------------------|
| 标准品/样本稀释液 (R1)<br>Standard/Sample<br>Diluent (R1)           | 1 × 20 mL | RM00023 | 可在 2-8° C 存储 1 个月。 |
| 生物素化抗体稀释液 (R2)<br>Biotin-Conjugate<br>Antibody Diluent (R2) | 1 × 12 mL | RM00024 |                    |
| 链霉亲和素-HRP 稀释液<br>(R3)<br>Streptavidin-HRP<br>Diluent (R3)   | 1 × 12 mL | RM00025 |                    |
| 浓缩洗涤液 (20x)<br>Wash Buffer (20x)                            | 1 × 30 mL | RM00026 |                    |
| 显色底物 TMB Substrate                                          | 1 × 12 mL | RM00027 |                    |
| 终止液 Stop Solution                                           | 1 × 6 mL  | RM00028 |                    |
| 封板膜 Plate Sealers                                           | 4 张       |         |                    |
| 说明书 Specification                                           | 1         |         |                    |

## **实验所需的材料**

1. 酶标仪，并配置主波长 450nm，次波长 630nm 或 570nm。
2. 单/多通道移液器及吸头。
3. 去离子水或蒸馏水。
4. 洗瓶或是自动洗板机。
5. 恒温箱。
6. 灭菌的试管或是 EP 管，用于样本或是标准蛋白的稀释。

## **重要提示**

### **\*本产品仅用于科研，不能用于临床诊断。**

1. 请留意产品标签上的有效期时间，并在有效期前使用本产品。
2. 请勿将不同批次或者来自不同厂家的试剂混合使用。
3. 如测试获得的样本 OD 值超过了产品的最高检测限，请使用产品中的标准品/样本稀释液（R1）对样本进行稀释。所以，在正式测试样本前，建议先进行样本的预测试。
4. 实验过程中的加样、洗板、孵育时间、孵育温度等操作均会对最终结果造成影响，请严格管理实验流程并做好记录。
5. 样本的收集、处理及保存均会对检测结果产生影响，请务必严格管理样本的处理过程。
6. 在本试验中对所有因素进行试验之前，不能排除干扰的可能性。

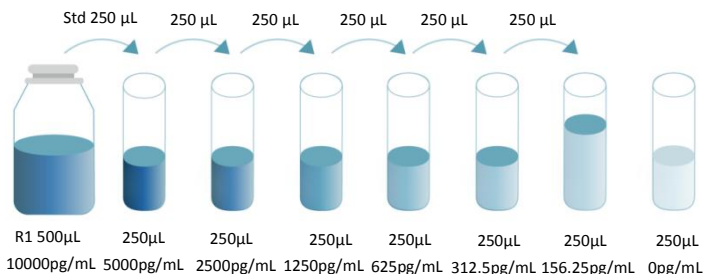
7. 相关试剂中可能存在有害物质，使用中请注意佩戴手套，必要时佩戴护目镜。
8. 终止液为腐蚀性液体，请做好相关防护。
9. 为保证最佳检测效果，相关试剂组分的保存请参照标签或是说明书。
10. 试剂配制后的混匀对检测结果非常重要，但部分蛋白或是抗体可能对剧烈的涡旋非常敏感，可能造成活性损失，请谨慎使用涡旋。
11. 请使用灭菌的耗材进行试剂配制，以免造成试剂污染，影响最终检测结果。
12. 为保证最佳检测效果，溶解后的标准蛋白及相关试剂的工作液不建议冻存后重复使用。
13. 产品在储存或是使用中，请注意避光。
14. 为保证最佳检测效果，在加不同样本时，请注意更换吸头。
15. 请严格按照说明书的要求进行试剂配制。如果您将分次使用试剂盒，请使用封口袋密封好预包被板，并且在开封后的 1 个月内使用完。
16. 48T 的试剂盒也同样可参考说明书进行实验。

## **样本收集与保存**

1. 细胞培养上清：1000 xg 离心 10 分钟，及时检测；或将样本置于-20 至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。如果细胞培养上清样本的稀释度比较大，可先用培养基进行中间的稀释，最后用标准品/样本稀释液(R1)稀释。
2. 血清：使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 xg 离心 10 分钟并及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。
3. 血浆：收集血浆时用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，在 30 分钟内 1000 xg 离心 15 分钟收集样本，及时检测；或将样本置于-20℃至-70℃中分装保存（24 小时内检测可置于 2-8℃），避免反复冻融。
4. 其它生物体液：1000×g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将上清置于-20℃ 或-80℃保存，避免反复冻融。
5. 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本。

## 试剂准备

1. 使用前将所需使用的试剂平衡至室温。如果浓缩液中有结晶析出，需要将试剂置于室温轻轻摇动，直至晶体完全溶解。
2. 标准品：向冻干品中加入 0.5ml 的标准品/样本稀释液 R1，轻轻混匀至少 15min，使冻干品完全溶解至浓度为 10000pg/mL。按照下图准备好包含 R1 稀释液的 EP 管，并按照提示进行梯度稀释(建议标准曲线使用以下浓度：10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 0pg/mL)。



3. 浓缩生物素化抗体 (100x)：在使用前用生物素化抗体稀释液 (R2) 将浓缩生物素化抗体以 1：100 的比例稀释，注意：稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。
4. 浓缩链霉亲和素-HRP (100x)：在使用前用链霉亲和素-HRP 稀释液 (R3) 将浓缩链霉亲和素-HRP 以 1：100 的比例稀释。注意：



稀释后的工作液应在 30 分钟内使用。

5. 洗涤液：在使用前用双蒸水或去离子水将洗涤液以 1：20 的比例稀释。

## **样本准备**

不同的样本需要根据具体情况选择合适的稀释倍数，稀释样本请使用试剂盒内的标准品/样本稀释液（R1）。

1. 细胞上清：由于细胞上清样本因实验条件不同，呈现较大的差异，故细胞上清样本建议进行预测试来决定合适的稀释倍数，样本稀释请使用标准品/样本稀释液（R1）或是 PBS。
2. 血清/血浆：样本经测试，建议原液使用。

## **实验步骤**

为获得理想的实验结果，请注意，所需使用的试剂在使用前平衡到室温。

1. 从板框上取下待用的微孔板条，将剩余的板条放回装有干燥剂的铝箔袋中，然后重新密封保存。
2. 每孔加入 1x 洗涤缓冲液 350  $\mu$  L，静置 40 秒后弃去液体，该步骤共洗涤 3 次。
3. 在空白孔中添加 100  $\mu$  L 标准品/样本稀释液 (R1)。
4. 在其他孔中分别加入 100  $\mu$  L 不同浓度的标准品或样品，用提供的封板膜封闭板孔，37℃ 孵育 2 小时。
5. 在使用前 15 分钟配制好生物素化抗体 (100x) 工作液。
6. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
7. 每孔中加入生物素化抗体工作液 (100  $\mu$  L/孔)，并盖上新的封板膜，37℃ 下孵育 1 小时。
8. 使用前 15 分钟配制好链霉亲和素-HRP (100x) 的工作液。
9. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
10. 每孔中加入链霉亲和素-HRP 工作液 (100  $\mu$  L/孔)，并盖上新的封板膜，37℃ 孵育 30 分钟。
11. 预热酶标仪。
12. 弃去孔中液体，重复步骤 2 中的洗涤步骤。
13. 向孔中加入 TMB 底物 (100  $\mu$  L/孔)。在 37℃ 下避光孵育 15-20 分钟。

14. 加入终止液（50  $\mu$  L/孔），并立即放入酶标仪，在 5min 内测定每个孔 450nm 的 OD 值。如果可以选择校正波长，则设置为 570 nm 或 630 nm。 并从 450 nm 的读数中减去 570 nm 或 630 nm 的读数，这种方式可以校正并去除非显色物质的 OD 值，从而获得更准确的检测结果。如果无法选择校正波长，则获得的读数将偏高，导致读数的准确度下降。

## 简要实验流程

准备好需要的标准品和试剂

洗板 3 次



向孔中加入 100ul 标准品或待测样本

37℃ 孵育 2 小时，然后洗板 3 次



每孔加 100ul 生物素化抗体工作液

37℃ 孵育 1 小时，然后洗板 3 次



每孔加 100ul 链霉亲和素-HRP 工作液

37℃ 孵育 0.5 小时，然后洗板 3 次



加入 100ul 底物溶液，37℃ 避光，孵育 15-20 分钟



加入 50ul 终止液



5min 内检测 450nm 波长的 OD 值

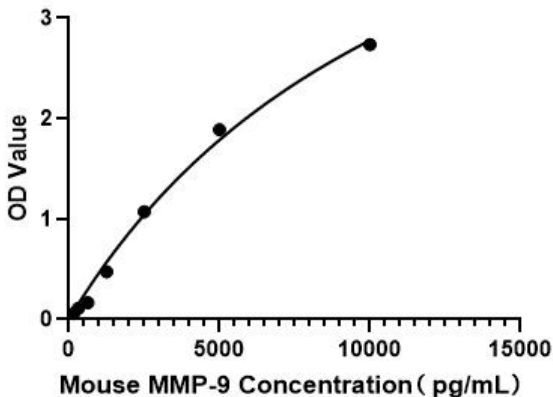
校正波长设置为 570nm 或 630nm

## **结果计算**

1. 计算标准蛋白各浓度、质控、样本等复孔的平均 OD 值，每个测试的 OD 值都应减去空白孔的 OD 值以及次波长的 OD 值。
2. 使用测试获得的 OD 值绘制标准曲线，推荐使用 4-PL 拟合，具体也可根据需求选择其他拟合方式来绘制标准曲线。使用计算机软件以吸光度 OD 值为纵坐标(Y)，相应的 MMP-9 标准品浓度为横坐标(X)，绘制标准曲线。样品的含量可根据其 OD 值由标准曲线计算出相应的浓度。
3. 如果样本在上样检测时进行了稀释，那么计算获得浓度需要乘以相应的稀释倍数。

## 典型数据

此标准曲线图仅供参考，计算实验结果请以实际实验数据进行。



## 检测范围

156.25-10000pg/mL

## 灵敏度

最低检测 MMP-9 可达 78pg/mL。

## **特异性**

本试剂盒可用于检测重组/天然小鼠 MMP-9。

以 50ng/mL 平行做特异性试验，与下列细胞因子蛋白均未见发生交叉反应。

### **重组小鼠**

Lipocalin-2/NGAL

### **重组大鼠**

MMP-8

MMP-9

### **重组人**

MMP-1

MMP-2

MMP-3

MMP-7

MMP-8

MMP-9

MMP-10

MMP-12

MMP-13

MMP-14 (aa284)

MMP-16 (aa32-291)

## 精密度

### 批内差

在同一块板上重复测试三个已知浓度的样品 20 次，计算浓度的变异系数（CV）。

批内  $CV < 10\%$ 。

### 批间差

用两批试剂盒对三个已知浓度的样品分别进行 20 次测试，计算浓度的变异系数（CV）。

批间  $CV < 15\%$ 。

|             | 批内精密度 |       |        | 批间精密度 |       |        |
|-------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| 样本          | 1     | 2     | 3      | 1     | 2     | 3      |
| 数量          | 20    | 20    | 20     | 20    | 20    | 20     |
| 浓度 (pg/mL)  | 170   | 1760  | 7950   | 190   | 1850  | 7980   |
| 标准偏差 (SD)   | 7.65  | 80.96 | 389.55 | 11.4  | 107.3 | 486.78 |
| 变异系数 CV (%) | 4.5   | 4.6   | 4.9    | 6.0   | 5.8   | 6.1    |



## 回收率

将高、中、低 3 个不同浓度的 MMP-9 蛋白加入到对应的样本中检测，并计算蛋白的回收率（实际测试的样本浓度/理论样本浓度 x100%）。

| 样本类型       | 平均回收率 (%) | 范围 (%) |
|------------|-----------|--------|
| 细胞上清 (n=5) | 98        | 90-108 |
| 血清 (n=5)   | 104       | 91-116 |

## 线性

将高浓度 MMP-9 加入样本中，在标准曲线范围内稀释并计算线性。

| /    | /         | 细胞上清 (n=5) | 血清 (n=5) |
|------|-----------|------------|----------|
| 1:2  | 平均符合率 (%) | 100        | 89       |
|      | 范围 (%)    | 90-110     | 87-95    |
| 1:4  | 平均符合率 (%) | 104        | 92       |
|      | 范围 (%)    | 93-115     | 89-95    |
| 1:8  | 平均符合率 (%) | 106        | 89       |
|      | 范围 (%)    | 96-116     | 85-97    |
| 1:16 | 平均符合率 (%) | 104        | 90       |
|      | 范围 (%)    | 90-118     | 84-98    |

## ELISA 常见问题分析及解决方法

| 问题描述        | 可能原因         | 解决方法                              |
|-------------|--------------|-----------------------------------|
| 高背景值        | 洗板不充分        | 按要求充分洗涤，保证洗板时间、次数及每孔加样量无误         |
|             | 孵育条件不正确      | 检查孵育时间、温度是否按要求进行                  |
|             | 试剂、样本的交叉污染   | 注意实验过程中可能造成样本交叉污染的操作；配制新鲜的试剂，重复测试 |
| 无信号值或过低的信号值 | 试剂配制和使用错误    | 检查试剂配制浓度是否正确，是否按照顺序使用             |
|             | 酶标仪使用、设置不正确  | 提前预热；设置正确的主、次波长读数                 |
|             | 显色时间过短       | 最佳显色时间应控制在 15-25min               |
|             | 终止后，未及时读数    | 加入终止液后，在 5min 内读数                 |
|             | 样本基质效应       | 使用阳性质控品对照测试                       |
| 过强的信号值      | TMB 底物变质     | 检查 TMB 底物是否变蓝，使用新的底物试剂            |
|             |              | 避免使用金属物质接触底物造成变质失效                |
|             | 每步实验未更换新的封板膜 | 每步实验更换新的封板膜                       |
|             | 样本中目标蛋白量过高   | 预测试，选择适当稀释倍数测试                    |

|      |           |             |
|------|-----------|-------------|
| 重复性差 | 加样量不均一    | 检查移液器，定期校准  |
|      | 样本有杂质或沉淀物 | 样本使用前，请离心样本 |
|      | 试剂配制未充分混匀 | 加样前充分混匀试剂   |

\*For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.