

基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
P0338S	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒	100 次
P0338M	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒	500 次

产品简介:

- 碧云天研发的基质金属蛋白酶3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒(MMP-3 Activity Fluorometric Assay Kit, or MMP-3 Activity Assay Kit (Fluorometric)), 是一种用荧光法快速高灵敏检测细胞、组织或血液等样品中基质金属蛋白酶3 (Matrix Metalloproteinase-3, MMP-3)活性的试剂盒。
- 基质金属蛋白酶3 (MMP-3, 也称MMP3)又称基质分解素1 (stromelysin-1), 是MMP家族的重要成员之一, 分子量约为57kDa。依据结构特点, MMP-3可分为3个结构域。(1)氨基端分泌信号肽和前体肽结构域, 由分泌信号肽(约17aa)和前体肽(约80aa)组成。新翻译形成的全长MMP-3称为pre-pro-MMP-3, 分泌信号肽可引导新合成的pre-pro-MMP-3分泌到细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 同时在分泌过程中信号肽被剪切去除而形成MMP-3前体 (pro-MMP-3)。而前体肽中的“半胱氨酸开关”序列中的半胱氨酸与 Zn^{2+} 协同作用, 可以保持pro-MMP-3处于非激活形式。MMP-3前体被纤溶酶(plasmin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)等丝氨酸蛋白酶水解酶(serine protease)剪切去除包含半胱氨酸开关的前体肽, 就会被激活形成具有蛋白酶活性的MMP-3。(2)氨基端催化结构域, 其中包含一个保守的 Zn^{2+} 结合位点, 为整个蛋白酶的活性部位。(3)羧基端结构域, 该结构域的氨基酸序列与血红素结合蛋白相似, 是MMP-3与底物相结合的部位。MMP-3能够降解或剪切多种细胞外基质成分、前体蛋白或前体酶等, 具体包括Collagen α -chains, Aggrecan, Laminin, Fibronectin, Elastin, Casein, α -1 Antitrypsin, Myelin Basic Protein, IL-1 β , IGFBP-3, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13等, 能破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障、释放E-钙粘蛋白(E-cadherin)、促进肿瘤侵袭转移、促进炎症反应, 在肿瘤等的研究中日益受到重视。此外, MMP-3还参与组织形态发生、损伤修复、炎症反应等一系列生理、病理过程, 在风湿性关节炎、动脉粥样硬化等疾病发生发展过程中发挥重要作用。
- 本MMP-3活性荧光检测试剂盒采用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的方法, 其检测原理如下。MCA是荧光供体(Donor), Dnp是荧光受体(Acceptor)或称为淬灭基团(Quencher), 供体的发射光谱和受体的激发光谱有一定的重叠, 当这两个荧光基团间的距离合适时(一般7-10nm), 荧光能量由供体向受体转移, 导致供体荧光分子的荧光强度衰减。MCA和Dnp被连接到MMP-3酶的天然底物上的两端, 当MMP-3蛋白酶没有切割该底物时, 两个基团足够接近, 发生荧光共振能量转移, 即Dnp可淬灭MCA的荧光而导致检测不到荧光; 当该底物被MMP-3蛋白酶切割后, 多肽的首尾两端分离, 两个基团分开, MCA的荧光不再被Dnp淬灭, 即可检测到MCA的荧光, 这样通过荧光检测就可以非常灵敏地检测MMP-3蛋白酶的酶活性。MCA的最大激发波长为325nm, 最大发射波长为393nm。

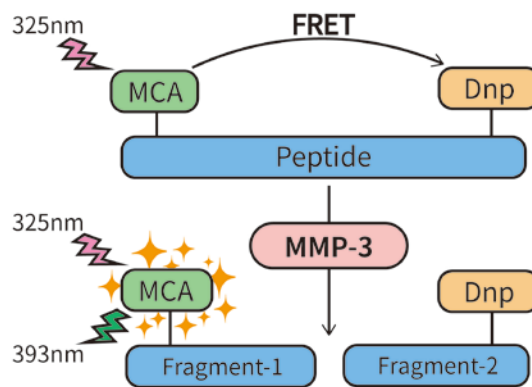


图 1. 基质金属蛋白酶 3(MMP-3)活性荧光检测试剂盒检测 MMP-3 活性的原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。96孔板中, 本试剂盒最少可以检测到20 μ U的MMP-3活性, 通常1-10 μ l细胞或组织样品足够用于本试剂盒的荧光法检测。
- 本试剂盒特异性强。本试剂盒使用的底物为NFF-3的相应肽段序列, 可非常快速地被MMP-3切割($k_{cat}/K_m=218,000s^{-1}\times M^{-1}$), 而对于MMP-9则较慢($k_{cat}/K_m=10,100s^{-1}\times M^{-1}$), 几乎不会被MMP-1或MMP-2识别而切割, 所以NFF-3肽段序列作为底物可以特异性地用于MMP-3活性的检测而区别于其它基质金属蛋白酶。
- 本试剂盒适用范围广, 使用灵活, 检测速度快, 通用性好。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆以及肝脏等组

织或细胞样品的检测，不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(high-throughput screening)的自动化操作系统，灵敏性强。本试剂盒使用胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)对MMP-3前体进行激活，激活时间仅需要5分钟，而其它试剂盒使用APMA激活方式的一般需要约24小时的激活时间。本试剂盒通用性好，经测试，不仅本试剂盒提供的MMP-3检测缓冲液处理的样品，常规的蛋白裂解液处理的样品也可以用本试剂盒的检测，并且提供了纯化的MMP-3酶作为阳性对照，便于检测体系的建立和确认。

- **本试剂盒可以进行MMP-3的绝对活性检测。**本试剂盒提供了MCA标准溶液，可以通过设置标准曲线，计算出样品中的MMP-3绝对活性。
- 对于96孔板，本试剂盒的小包装P0338S可以进行100次检测，中包装P0338M可以进行500次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0338S-1	Assay Buffer	30ml
P0338S-2	MMP-3 Positive Control (10X)	5 μ l
P0338S-3	α -Chymotrypsin	120 μ l
P0338S-4	Serine Proteinase Inhibitor	120 μ l
P0338S-5	MCA Standard (10mM)	20 μ l
P0338S-6	Substrate	500 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0338M-1	Assay Buffer	120ml
P0338M-2	MMP-3 Positive Control (10X)	20 μ l
P0338M-3	α -Chymotrypsin	600 μ l
P0338M-4	Serine Proteinase Inhibitor	600 μ l
P0338M-5	MCA Standard (10mM)	100 μ l
P0338M-6	Substrate	2.5ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C 保存，一年有效。其中 P0338-6 Substrate 需避光保存。

注意事项：

- Assay Buffer、MCA Standard (10mM) 和Substrate需完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。MMP-3 Positive Control (10X)和 α -Chymotrypsin使用时应置于冰上，使用完毕后各试剂应立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 体积较小的试剂首次使用时建议先离心数秒使液体沉降于管底，然后再使用。结冻的试剂必须完全融化并混匀后使用。
- 如果使用本试剂盒提供的Assay Buffer制备样品，并且加入的样品量在本试剂盒的推荐范围内，可以确保反应体系的pH值在适宜的范围内。如果使用自行配制的裂解液，请确保加入样品后反应体系的pH值在7.5-8.0之间，或者确保样品的pH值在7.5-8.0之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 样品经 α -Chymotrypsin预处理后检测的是样品中的总MMP-3 (包括无活性的MMP-3前体和激活的MMP-3)，如果只需要检测样品中的已激活的MMP-3活性则不需要使用 α -Chymotrypsin进行预处理。
- 样品中如果有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等蛋白酶，可能会对酶活性的检测产生一定的影响，可加入试剂盒提供的广谱的丝氨酸蛋白酶抑制剂Serine Proteinase Inhibitor进行抑制。本试剂盒中提供的 α -Chymotrypsin和Serine Proteinase Inhibitor的使用量经过优化，不会对酶活性的检测产生显著影响。
- 样品和MMP-3 Positive Control首次经 α -Chymotrypsin激活后，可在-20 $^{\circ}$ C储存，后续可直接使用，无需再次激活，且反复冻融5次对激活后的MMP-3酶活性基本无影响。
- EDTA等金属螯合剂，对MMP-3酶活性有影响，处理样品时应避免EDTA等螯合剂的加入。
- 检测时建议使用96孔黑板，推荐选购碧云天的BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(FCP966)。
- 血清、血浆等样品如果置于4 $^{\circ}$ C保存，保存的时间不应超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20 $^{\circ}$ C保存，-80 $^{\circ}$ C保存更佳。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备。

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25 $^{\circ}$ C下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4 $^{\circ}$ C约1000-2000 \times g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素进行抗凝，4 $^{\circ}$ C约1000-2000 \times g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。

血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。

- b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，吸净培养液，如有必要可以使用PBS洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体，如有必要可以使用PBS洗涤一次并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl本试剂盒提供的Assay Buffer，适当吹打以裂解细胞，如有必要可以冰浴5-10分钟以进一步充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl Assay Buffer的比例进行匀浆；或者组织样品液氮研磨后按照每10mg组织样品加入100μl Assay Buffer的比例进行裂解，如有必要可以冰浴5-10分钟以使裂解充分。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。
- c. 样品MMP-3活性检测时空白对照的准备：推荐使用Assay Buffer作为空白对照(Blank Control)，或者使用适当的用于样品裂解或稀释的裂解液或稀释液作为空白对照。

2. 试剂盒的准备。

将 Assay Buffer、Substrate、MCA Standard (10mM)和 α -Chymotrypsin 平衡至室温后分别混匀备用。其它试剂存置于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

3. 阳性对照的准备以及样品中MMP-3前体的激活。

本试剂盒中的MMP-3 Positive Control (10X)为MMP-3前体，作为阳性对照使用之前需要使用试剂盒中提供的 α -Chymotrypsin 进行激活处理。此外，由于细胞、组织或血液等样品中含无活性的MMP-3前体和有活性的激活成熟的MMP-3，如果需要检测总MMP-3活性，则需要使用试剂盒中提供的 α -Chymotrypsin 进行预处理以激活MMP-3前体。如果只需要检测样品中已激活的MMP-3活性，则不需要使用 α -Chymotrypsin 进行预处理，但仍建议加入 Serine Proteinase Inhibitor 以抑制样品中可能的其它丝氨酸蛋白水解酶。

- a. 阳性对照的准备：取适量MMP-3 Positive Control (10X)，并按后续步骤进行处理。例如，取2μl的MMP-3 Positive Control (10X)，加入17μl Assay Buffer并混匀，再加入1μl α -Chymotrypsin并混匀，37°C孵育5min。再加入1μl Serine Proteinase Inhibitor以抑制多余的 α -Chymotrypsin活性，混匀并放置1-2min，即得激活的MMP-3 Positive Control (1X)。96孔板检测时，通常每孔加入5μl MMP-3 Positive Control (1X)作为阳性对照即可。注：如果阳性对照由于反复冻融或其它原因导致效价降低，96孔板检测时也可以每孔加入10μl。
- b. (选做)样品中MMP-3前体的激活。如果需要检测包含未激活的MMP-3前体的总MMP-3活性，需要进行本操作步骤。取适量的样品于1.5ml离心管中，加入1μl α -Chymotrypsin，再加入Assay Buffer补足至20μl，混匀，37°C孵育5min。
- c. 样品中丝氨酸蛋白水解酶的抑制。取适量样品加入Assay Buffer补足至20μl，或取步骤3b中经 α -Chymotrypsin处理的样品，加入1μl Serine Proteinase Inhibitor，混匀并放置1-2min。此时样品的稀释倍数(21 /样品微升数)记录为Dil₁。
- d. (选做)总MMP-3活性检测时空白对照的准备：在1.5ml离心管中加入19μl Assay Buffer及1μl α -Chymotrypsin，混匀，37°C孵育5min。加入1μl Serine Proteinase Inhibitor，混匀并放置1-2min，即为空白对照(Blank Control)。

4. MCA标准曲线设置。

取 2μl MCA Standard (10mM)，加入 198μl Assay Buffer，混匀，即为 200μl 100μM 的 MCA 溶液，分别取 0、1、2、5、10、20、50μl 的 100μM MCA 溶液加入 96 孔板中，并用 Assay Buffer 补足至 100μl，此时，MCA 标准曲线的各孔 MCA 浓度和物质的量分别为 0、1、2、5、10、20、50μM 或 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5nmol。也可自行设置适宜的 MCA 浓度进行标准曲线的设定。

5. 检测体系的设置。

参照下表依次加入试剂盒各组分及样品。初次检测时，待测样品可以稀释一系列浓度梯度，以确保最终检测值在标准曲线线性范围内。此时待测样品的稀释倍数记为 Dil₂。

Reagents	Blank Control	Positive Control	Sample
Assay Buffer	90μl	90μl	90μl
MMP-3 Positive Control (1X)	-	5μl	-
Blank Control	5μl	-	-
Sample	-	-	5μl
Total Volume	95μl	95μl	95μl

注 1：为获得更加可靠的检测结果，推荐每个样品设置 2-3 个平行孔。

注 2：Blank Control 可以是步骤 1c 中 MMP-3 活性检测时的空白对照，也可以是步骤 3c 中总 MMP-3 活性检测时的空白对照。

6. 检测。

- a. 振荡混匀1-2分钟，确保混合充分。
- b. 除MCA标准曲线外每孔加入5μl Substrate，混匀。注：加入Substrate后反应会立即开始，如果孔数较多的情况下，建议在低温或使用排枪操作以减小各孔间加入Substrate的时间差而导致的误差，混匀操作可在培养板振荡器上进行。
- c. 混匀后立即使用荧光酶标仪进行荧光测定。设置荧光酶标仪温度为37°C，激发波长为325nm、发射波长为393nm，每5分钟或10分钟读取一次荧光强度。

注 1：连续测定的时间间隔可以根据待测样品中 MMP-3 的酶活性进行调整，但是需确保获得 6 个点以上的数据。对于 MMP-3 的酶活较高的样品，建议测定总时间为 20-30 分钟，对应的测定间隔时间设为 2-5 分钟；对于 MMP-3 的酶活很

低的样品，可以延长测定总时间为1-2小时，对应的测定间隔时间设为10-20分钟。

注 2: 如果荧光酶标仪没有温控功能，也可以在室温测定，但这样检测出来的是室温条件下的酶活性，此时酶活性可能会偏低一些，不同的实验条件偏低的程度会有所不同。或者可以考虑在检测的间隔时间内在37°C 孵育。

7. 计算。

a. 计算每个样品孔和空白对照孔的平均荧光值，可分别记录为RFU空白对照、RFU阳性对照和RFU样品。RFU, Relative Fluorescence Unit。选取待测样品组荧光强度呈线性关系的时间点的数据用于分析，记录呈线性关系的时间间隔为T，时间间隔T内的荧光强度变化量为 ΔRFU ，即 $\Delta\text{RFU} = \text{RFU样品}(\text{Time b}) - \text{RFU样品}(\text{Time a})$ 。也可以直接比较各个样品在一定时间内的 ΔRFU 而确定样品的MMP-3相对活性，但须确保最终时间点时RFU读数未达平台。

b. 将标准曲线各孔的荧光值减去标准品零浓度孔的荧光值，建立MCA标准曲线。将 ΔRFU 代入标准曲线，即可算出在反应时间内样品中MCA的生成量(记录为A)。MCA的标准曲线请参考图2A，MCA在0.02-5nmol (即0.2-50 μM)范围内有良好的线性关系。MMP-3蛋白酶活性的计算公式如下：

$$\text{MMP-3 Activity (nmol/min/ml 或 mU/ml)} = A \times \text{Dil}_1 \times \text{Dil}_2 / (\text{V}_{\text{Sample}} \times T)$$

注: V_{Sample} 为检测时待测样品的体积，上述的推荐检测系统中为5 μl 即0.005ml，也可以检测样品的蛋白浓度而用蛋白量进行计算；

A 为步骤 7b 根据标准曲线确定的 MCA 的生成量(nmol)；

Dil_1 为步骤 3b 中的样品稀释倍数、 Dil_2 为步骤 5 中的样品稀释倍数；

T 为步骤 7a 中反应时间(min)。

MMP-3 酶活力单位 U (Unit)的定义为：1 个活力单位的 MMP-3 酶在 37°C 条件下，1 分钟内催化生成 1.0 μmol 的 MCA。也有把该酶活力单位的定义的温度条件设定为室温的。

注: 此处温度条件取决于酶标仪检测时设定的温度。

c. 虽然本试剂盒中的MMP-3底物特异性已经比较强，而且样品经过Serine Proteinase Inhibitor处理，但仍然有可能有一些蛋白酶可以切割本底物，建议进一步使用MMP-3特异性抑制剂或泛MMP抑制剂如Batimastat (SF4153, $\text{IC}_{50}=20\text{nM}$ for MMP-3)或Ilomastat (SF4180, $\text{IC}_{50}=27\text{nM}$ for MMP-3)进行验证。

d. 计算示例：待测样品的蛋白浓度经测定为21mg/ml，取1 μl 的样品于1.5ml离心管中，加入1 μl α -Chymotrypsin, Assay Buffer 补足至20 μl ，混匀，37°C孵育5min。加入1 μl Serine Proteinase Inhibitor，混匀并放置1-2min。此时样品的稀释倍数 Dil_1 为21，蛋白浓度为1mg/ml。检测时再将1mg/ml样品稀释10倍，即 Dil_2 为10，此时蛋白浓度为0.1mg/ml。取5 μl 稀释后的样品参考步骤5、6进行测定，测定时间设为30分钟。如果0分钟时的RFU待测样品(Time 0) = 35，30分钟时的RFU待测样品(Time 30) = 150，则 ΔRFU 待测样品 = 150 - 35 = 115，建立MCA标准曲线假设 $y = 215.59x + 14.812$ ，则 $115 = 215.59x + 14.812$ ， $x = 0.4647$ ，即30min内样品中MCA的生成量A为0.4647nmol。

$$\text{MMP-3 Activity (nmol/min/ml 或 mU/ml)} = 0.4647 \times 21 \times 10 / (0.005 \times 30) = 650.58 \text{ nmol/min/ml 或 } 650.58 \text{ mU/ml}$$

$$\text{或 MMP-3 Activity (nmol/min/mg 或 mU/mg)} = 0.4647 \times 21 \times 10 / (0.005 \times 30 \times 0.1) = 6505.8 \text{ nmol/min/mg 或 } 6505.8 \text{ mU/mg}$$

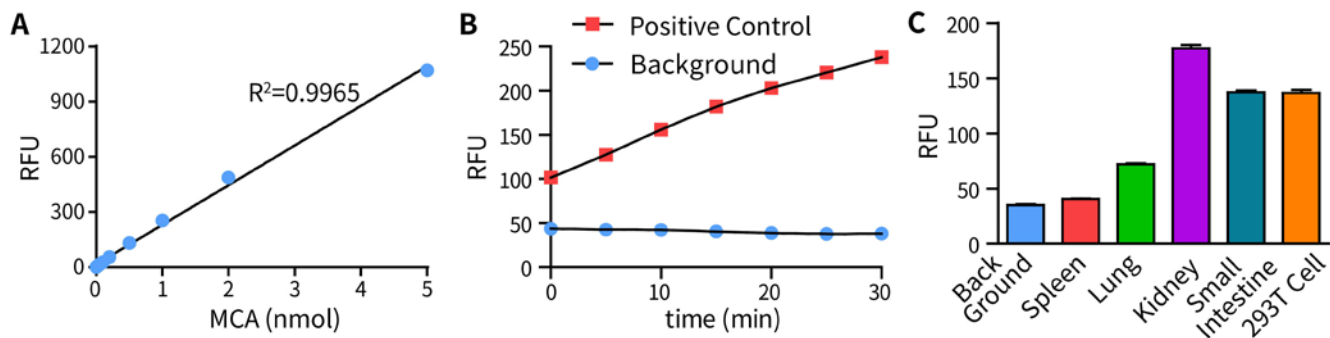


图2. 基质金属蛋白酶3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒的MCA标准曲线和对MCA阳性对照及组织、细胞样品的检测效果。A. 本试剂盒的MCA标准曲线示意图。B. 本试剂盒对MMP-3 Positive Control (1X)的检测效果。C. 本试剂盒对小鼠不同组织及293T细胞中的总MMP-3酶活性检测效果。其中小鼠脾、肺、肾脏及小肠组织总蛋白量都为20 μg ，293T细胞的总蛋白量为40 μg 。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0338S	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒	100 次
P0338M	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)活性荧光检测试剂盒	500 次
P0339S	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)抑制剂筛选试剂盒	100 次
P0339M	基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)抑制剂筛选试剂盒	500 次