中科瑞泰（北京）生物科技有限公司
Tel: 400-699-0631
http:// www.real-times.com.cn
E-mail: real-times@vip.163.com

明胶酶谱分析试剂盒（含预制胶） Ver.761074-1.0

货号	名称	规格
RTD6164	明胶酶谱分析试剂盒（含预制胶）	10 次

● 产品组成：

货号	名称	规格	保存
RTD6164-0010-12	10%明胶酶谱预制胶（12 孔）	10 片	4℃，严禁冷冻
RTD6164-02	10×复性缓冲液	100 mL	4℃
RTD6164-03	10×孵育缓冲液	200 mL	4℃
RTD6164-04	阳性对照（胶原酶）	100 μl	-20℃
RTD6202-02	FastBlue 蛋白染色液	500 mL	RT
PL112-01	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
	说明书	一份	

● 产品简介：

基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）是一类锌离子依赖性蛋白水解酶，参与细胞外基质的降解与重塑。其中，MMP-2（明胶酶 A）和 MMP-9（明胶酶 B）能够降解明胶及多种细胞外基质成分，广泛参与胚胎发育、组织修复、炎症反应、肿瘤侵袭与转移等生理和病理过程。MMP-2 和 MMP-9 通常以无活性的酶原形式合成并分泌至细胞外，经蛋白水解加工后可转变为活性形式。明胶酶谱法可同时检测酶原型和活性型 MMP-2、MMP-9，并根据其电泳迁移位置进行初步区分。

本试剂盒采用明胶酶谱法（gelatin zymography）检测样品中的明胶降解酶活性，主要用于 MMP-2 和 MMP-9 的分析。其原理是在 SDS-PAGE 凝胶中加入明胶作为酶反应底物。样品经非还原、非加热处理后进行电泳，使不同分子量的蛋白酶得到分离。电泳结束后，使用复性缓冲液去除凝胶中的 SDS，使部分蛋白酶恢复催化活性；随后在适宜条件下孵育，使复性后的蛋白酶降解其所在位置的明胶。经 FastBlue 蛋白染色后，未被降解的明胶形成蓝色背景，而发生明胶降解的区域呈现透明或浅色条带。通过条带位置及相对强度，可对样品中的明胶降解酶进行定性或半定量分析。

本试剂盒提供明胶酶谱分析的全套试剂，配套 10%明胶酶谱分析预制胶，可进行 10 次标准胶（8×10 cm）检测。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、运输及效期：

预制胶 4℃贮存，严禁冷冻；其他组份按照试剂盒标签贮存；常温运输；试剂盒有效期 60 天。

Real-Times 400-699-0631

● 技术规格：

塑料胶板尺寸	10×8.2 cm
凝胶尺寸	8.2×7.2 cm
凝胶厚度	约 1.1 mm
梳孔	12 齿
凝胶浓度	分离胶浓度 10%（含明胶底物），交联度 2.6C； 浓缩胶浓度 5%，交联度 2.6C
推荐上样体积	最优上样体积 10-20 μL，最大上样体积 35 μL
MMP-2/MMP-9 典型条带位置	Active-MMP2：~ 62-66 kDa；Pro-MMP2：~72 kDa Active-MMP9：~ 82 kDa；Pro-MMP9：~92 kDa 阳性对照（胶原酶）：55-130 kDa 区间产生明亮条带 注：上述分子量为 MMP-2 和 MMP-9 的典型参考值，实际迁移位置可能因蛋白来源、加工形式及电泳条件不同而有所差异。明胶酶谱还可能检测到其他具有明胶降解能力的蛋白酶。
推荐染色方法	推荐使用 FastBlue 蛋白染色液（RTD6202）快染
电泳缓冲液	Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液（TG120P）
推荐上样缓冲液	5×蛋白上样缓冲液 (变性，非还原)（PL112）
推荐电泳条件	推荐采用 80 V 浓缩、150 V 分离的两阶段电泳程序。具体电泳时间受电泳槽结构、缓冲液体积及样品迁移情况影响，以示踪染料前沿接近凝胶底部为终点。

● 使用说明：

一. 电泳缓冲液配制：

5×Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液（5×TGS）配制：将一袋电泳缓冲液粉末（TG120P）加入洁净容器中，加入约 900 mL 超纯水充分溶解，再用超纯水定容至 1000 mL，无需调节 pH，4℃贮存。将 5×TGS 用超纯水稀释 5 倍配成 1×TGS 进行电泳，如 200 mL 5×TGS 加入 800 mL 超纯水。

二. MMP 活性检测样品处理：

MMP-2、MMP-9 主要通过分泌途径进入细胞外环境，因此用于明胶酶谱检测活性时，细胞样品应优先收集培养上清；组织样品则以组织匀浆提取为主，必要时检测组织间液或组织培养上清。与普通 Western blot 不同，明胶酶谱需要保留 MMP 在电泳后恢复酶活的能力。**样品制备过程中应避免使用 EDTA、EGTA 等金属离子螯合剂，以及 DTT、β-巯基乙醇、TCEP 等还原剂。样品不得煮沸或加热变性，以免影响蛋白酶在电泳后的活性恢复。样品尽量低温处理，分装冻存，避免反复冻融。**

2.1 培养细胞样品制备：

2.1.1 细胞培养上清（首选，检测胞外 MMP）：

适用于 PC-3、DU145、成纤维细胞、肿瘤细胞及其他分泌 MMP 的细胞。

2.1.1.1 细胞培养：

贴壁细胞培养至约 70%–90%汇合度，吸去原培养基，使用 PBS 轻柔洗涤 2 次，以去除残留血清。

2.1.1.2 收集条件培养基：

加入适量无血清基础培养基，继续培养 12–24 h，收集细胞条件培养上清。对于 MMP 分泌量较低的细胞，可适当延长培养时间，但应避免因细胞死亡造成样品污染。

2.1.1.3 离心去除细胞：

Real-Times 400-699-0631

收集上清，4°C、500 × g 离心 5 min；取上清，再以 2,000 × g 离心 10 min，去除细胞及碎片。

2.1.1.4 直接检测或浓缩

上清可直接用于酶谱。当样品中的酶活含量较低时，可使用 30 kDa MWCO 超滤管浓缩 5–20 倍。浓缩过程尽量保持低温，并根据样品浓度和实际检测结果调整浓缩倍数。

2.1.1.5 保存：

立即检测，或分装后于 −80°C 保存。

注：含 FBS 培养基可能产生自身的明胶酶活性带，特别是在约 60–70 kDa 区域。因此，最好使用无血清条件培养基，并设置相同条件下未接触细胞的培养基空白对照。如果细胞无法耐受完全无血清培养，可以使用低血清培养条件，但必须保留培养基空白对照。

2.2 细胞裂解物（检测胞内 MMP）：

虽然 MMP-2、MMP-9 主要在细胞外发挥作用，但细胞内仍可能存在尚未分泌的前体蛋白。

2.2.1 PBS 洗涤细胞 2 次，收集约 1×10^6 个细胞。

2.2.2 加入 100 µL 冰冷 Western 及 IP 细胞裂解液（不含螯合剂）（WL1020F），冰上裂解 30 min。注：可以加入蛋白酶抑制剂提取蛋白，但不要引入 EDTA 或 EGTA。可选择使用蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA，片剂，通用型)（PC2930）。

2.2.3 4°C 16,000 × g 离心 15 min。

2.2.4 收集上清，测定蛋白浓度。

2.2.5 初次实验每孔上样 10–30 µg 总蛋白，根据酶谱结果调整。

2.3 组织样品制备：

组织中的 MMP 不仅存在于细胞内，还可能结合在细胞外基质（ECM）中。因此，组织匀浆中的 MMP 活性既取决于表达量，也取决于提取效率。

2.3.1 组织处理：

取新鲜组织 50 mg。冰冷 PBS 快速洗去表面血液，剪碎成约 1 mm^3 小块。

注：建议优先使用新鲜组织。冻存组织也可用于明胶酶谱检测，但应避免反复冻融，并注意冻存及解冻过程可能对检测结果产生影响。

2.3.2 加入提取液：

每 50 mg 组织加入 500 µL 冰冷 Western 及 IP 细胞裂解液（不含螯合剂）（WL1020F），即约 1:10（w/v）。建议优先使用不含螯合剂的温和型裂解液（WL1020F）。对于难以提取的组织蛋白，可尝试其他裂解条件如使用 RIPA 裂解液(强，不含抑制剂，不含螯合剂)（RL0120F），但应验证裂解液对明胶酶谱检测的影响。

注：可以加入蛋白酶抑制剂提取蛋白，但不要引入 EDTA 或 EGTA。可选择使用蛋白酶抑制剂 Cocktail (不含 EDTA，片剂，通用型)（PC2930）。

2.3.3 机械匀浆：

使用玻璃匀浆器，在冰上匀浆约 15–30 次，以组织充分破碎为准。尽量避免样品明显升温。

2.3.4 冰上提取：

冰上静置 30 min，期间轻轻混匀数次。

2.3.5 离心：

4°C 16,000 × g 离心 15 min，收集上清。保留沉淀供必要时进一步分析。

2.3.6 检测及保存

测定蛋白浓度，初次上样可试每孔 5、10、20 µg 总蛋白。剩余样品分装，-80°C 保存。

Real-Times 400-699-0631

2.4 样品电泳上样：

2.4.1 将 5×蛋白上样缓冲液（变性，非还原）（PL112）常温溶化后混匀。

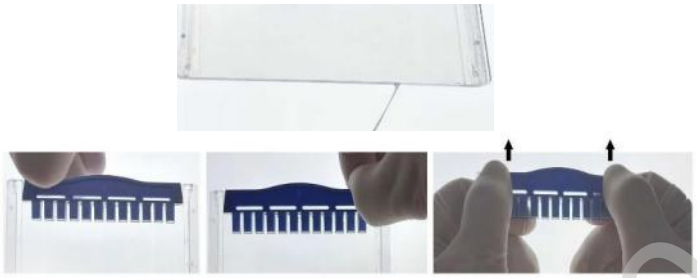
2.4.2 将上样缓冲液与蛋白样品按照 1:4 的比例混匀。

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还原剂如巯基乙醇，DTT 和 TCEP 等。

2.4.3 快甩离心收集到管底，**常温静置 10 min，不得煮沸或加热处理**，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）。

三. 电泳：

3.1 拆开预制胶包装，撕掉底部胶条，拔掉梳子，梳孔朝下轻甩胶板，去除胶孔中可能有的残胶，将预制胶安装在合适的电泳槽中。





注：伯乐 Mini III 或 Mini-PROTEAN Tetra Cell，天能 VE-180，六一 24K 系列电泳槽请确保密封条的安装方向（如右图）。六一其他系列，君意东方 JY-SCZ2/4，百晶 BG-verMINI 等电泳槽可以直接使用预制胶。不兼容 Thermo Fisher Mini Gel Tank 系列电泳槽。

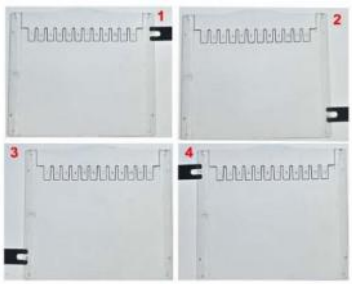
3.2 将电泳槽的内槽加满 1×TGS 缓冲液，没过梳孔，用 1 mL 移液器将梳孔吹洗干净，将 Marker 或蛋白样品（已经过处理）加入点样孔，稳压电泳（表 1），至当上样缓冲液中的蓝色示踪染料前沿接近分离胶下沿时停止电泳。

表 1 蛋白电泳条件

	推荐电压	电泳时间
浓缩胶	恒压 80 V	~15 min
注：80 V 恒压运行约 15 min，使样品完成初步浓缩；随后调至 150 V 继续分离。不同电泳槽、缓冲液体积及环境温度可能造成少量差异。		
分离胶	恒压 150 V	~35 min
建议按照推荐电压运行。提高电压会增加凝胶及电泳缓冲液的焦耳热，可能蛋白条带弯曲、扩散或分辨率下降。电泳过程中如缓冲液温度明显升高，可适当降低电压或采取冷却措施。		

3.3 拆胶：

使用配套工具撬动胶板（参见右图），小心剥下凝胶。



四. MMP 检测：

4.1 漂洗：

取出凝胶，放入容器内，加入适量蒸馏水漂洗凝胶，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。

Real-times 400-699-0631

4.2.2 复性：

取出凝胶，弃蒸馏水，加入 100 mL 1×复性缓冲液，37℃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 20 mL 10×孵育缓冲液加 180 mL 蒸馏水。

4.3.2 第一次孵育：

倒掉 1×复性缓冲液，加入 100 mL 1×孵育缓冲，37℃ 摇床慢摇 10 分钟；

4.3.3 第二次孵育：

弃 1×孵育缓冲液，加入 100 mL 1×孵育缓冲液，于 37℃缓慢摇动孵育 4–16 h。具体孵育时间根据样品中明胶降解酶的活性及反白带显色程度进行调整。

注：阳性对照-胶原酶通常 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，孵育过程中注意密封，防止孵育液挥发。

4.4 显色：

4.4.1 漂洗：倒掉孵育液，凝胶中加入适量蒸馏水覆盖凝胶，摇床慢摇 5 分钟，重复一次。

4.4.2 弃蒸馏水，加入适量 FastBlue 染色液（以刚刚覆盖过胶面为适，需要 50-100 mL），摇床上常温摇动 30 分钟-2 小时，凝胶经 FastBlue 蛋白染色后，未被降解的明胶呈蓝色背景，具有明胶降解活性的区域形成透明或浅色条带。染色结束后使用蒸馏水漂洗，以获得清晰的酶谱图像。

4.5 拍照：

建议使用透射光源如凝胶观察透射灯（RT3820）拍摄明胶酶谱图像，以提高透明条带与染色背景之间的对比度。拍照时应避免过度曝光，以免影响条带强度的比较。

五. 明胶酶谱结果判读注意事项：

5.1 MMP-2 和 MMP-9 的酶原型及活化型均可能在明胶酶谱中形成透明条带。透明条带表明该位置存在经复性后能够降解明胶的蛋白酶，不代表样品中的蛋白酶在检测前均处于活化状态。

5.2 MMP-2 的典型条带约为 72 kDa（酶原型）和 62–66 kDa（活化型）；MMP-9 的典型条带约为 92 kDa（酶原型）和 82 kDa（活化型）。

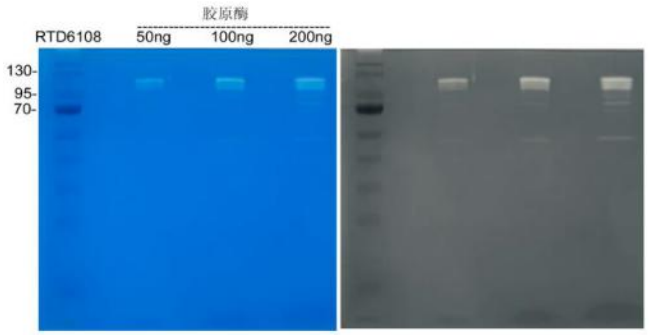
5.3 明胶酶谱并非 MMP-2/MMP-9 特异性检测方法，其他具有明胶降解能力的蛋白酶也可能产生透明条带。

5.4 不同样品之间比较条带强度时，应保持上样量、复性条件、孵育时间和染色条件一致，并避免条带过度降解造成信号饱和。

5.5 含血清培养基可能产生背景明胶降解条带。检测细胞培养上清时，建议设置未接触细胞的培养基空白对照。

Real-times 400-699-0631

六. 实验示例：



不同上样量胶原酶阳性对照的明胶酶谱检测结果

凝胶：10%分离胶（含明胶底物）

电泳条件：1×TGS，恒压 150 V，电流变化 36-12 mA，电泳时间 55 min

实验步骤：漂洗-蒸馏水漂洗两次；复性-100 mL 1×复性缓冲液 37℃复性 30 分钟；孵育-100 mL 1×孵育缓冲液 37 度孵育 10 分钟； 100 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；蒸馏水漂洗两次，每次 5 分钟；

实验结果：胶原酶阳性对照经电泳、复性及孵育后，可在在 55-130 kD 区间产生明亮明胶降解条带，表现为蓝色背景上的透明或浅色区域。本阳性对照主要用于验证明胶酶谱凝胶及检测流程的有效性，不作为 MMP-2 或 MMP-9 的分子量标准。不同样品中的明胶降解条带应结合分子量参考、特异性抑制实验或其他检测方法进行鉴定。

Real-Times 400-699-0631