

明胶酶谱法检测试剂盒

仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称

明胶酶谱法检测试剂盒

产品概述

明胶酶谱法的基本过程是先将样品进行SDS-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE, 含0.1%明胶) 电泳分离, 然后在有二价金属离子存在的缓冲系统中使样品中的MMP-2和MMP-9恢复活性, 在各自的迁移位置水解凝胶里的明胶, 最后用考马斯亮蓝将凝胶染色, 再脱色, 在蓝色背景下可出现白色条带, 条带的强弱与MMP-2和MMP-9活性成正比。

包装信息

试剂盒组分	P17851 (10T)	保存条件
1%明胶	10ml	4°C
4×上样缓冲液	1ml	4°C
洗脱液	800ml	4°C
漂洗液	400ml	4°C
孵育液	250ml	4°C
染色液	200ml	室温
脱色液	200ml	室温

操作流程

1. 样本制备。
 - a. 细胞上清：
 - (1) 取6孔板中对数生长期的肿瘤细胞, 用无血清培养基冲洗3次, 每孔中加入1ml无血清培养基, 实验分组, 加入干预因素, 37°C、5%CO₂恒温培养箱中培养24h。
 - (2) 将细胞培养上清液移入离心管中, 4°C、2000rpm离心10min, 取上清分装后-80°C保存备用。
 - (3) BCA法定测定各样品蛋白浓度, 根据不同浓度确定样品的上样体积, 保证各样品上样的蛋白质量相同, 与4×上样缓冲液5μl混合, 总体积不足20μl用三蒸水补足 (可以根据制胶时孔的大小决定上样总体积) 。
 - b. 血清: 取适量血清直接与4×上样缓冲液等体积混匀, 如酶活性太高造成显带不理想, 可适当进行稀释。
2. 参照表一配制10%分离胶 (含1%明胶) 和5%浓缩胶, 制胶, 等胶干之后, 加入电泳缓冲液, 使其溢满上样孔。
3. 上样, 4°C、100V进行SDS-PAGE 电泳, 直至溴酚蓝跑至分离胶的底部。
4. 电泳结束后, 切取包括72KD和92KD合适大小的凝胶放置于洗脱液中振荡洗脱4次, 每次15min。
5. 漂洗液中震荡漂洗2次, 每次20min。
6. 孵育液中, 37°C水浴锅中孵育48h。
7. 染色液中摇床上震荡染色3h。
8. 将凝胶置于脱色液中, 震荡脱色2h。
9. 脱色完成后, 在蓝色背景上, 可见72KD和92KD处为白色条带。

表一: 10%分离胶 (含1%明胶) 和5%浓缩胶的配制。

组分	10%分离胶	5%浓缩胶
d ₃ H ₂ O	3.1ml	2.85ml
30%丙烯酰胺溶液	3.3ml	0.85ml
Tris-HCl, PH=6.8		1.25ml
Tris-HCl, PH=8.8	2.5ml	
10% SDS	100μl	50μl
10%过硫酸铵 (AP)	50μl	25μl
TEMED	10μl	10μl
1%明胶	1ml	