版本号： Datasheet-SE60002-A.0

生效日期： 2025-08-27

Speedy™ 小鼠Mmp9一步法ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号：	SE60002
规 格：	96T
灵敏度：	21.9 pg/mL
检测范围:	78.1-5000 pg/mL
用 途：	此试剂盒用于定量检测血清、血浆、细胞上清以及组织裂解液中小鼠Mmp9浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

目录

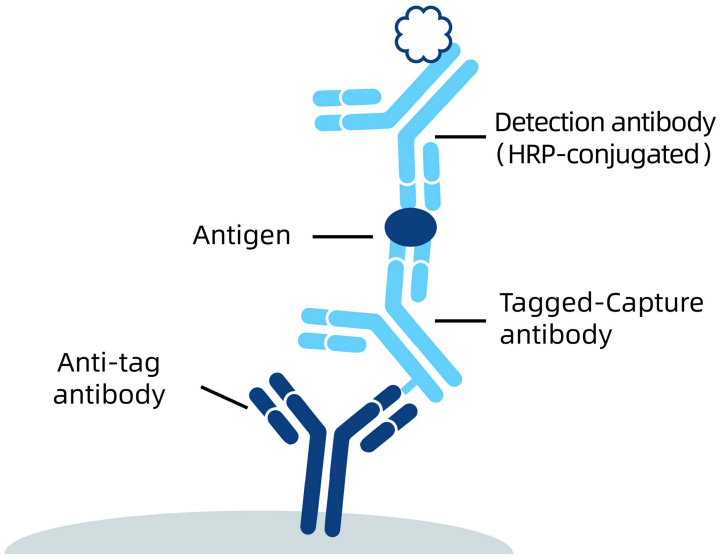
一：背景信息 3
二：检测原理 3
三：需自备的实验器材 3
四：试剂盒组分及储存 4
五：实验注意事项 4
六：样本准备 5
七：试剂准备 5
八：实验步骤 6
九：实验参数 7
9.1 参考标曲图 7
9.2 精密度 8
9.3 加标回收率 8
9.4 样本值 8
9.5 灵敏度 8
9.6 线性 9
9.7 特异性 9
十：参考文献 9

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

一：背景信息

MMP9是一种参与肿瘤生长和转移过程中基质重塑的细胞外酶，是胃癌的不良预后因素。MMP9是一种诱导型MMP，由肿瘤上皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、其他炎症细胞、成纤维细胞基质和肿瘤相关内皮细胞异质表达。激活MMP9可以释放细胞因子、生长因子和生物活性蛋白片段，调节炎症、新生血管和基质重塑。

二：检测原理



抗标签抗体预先包被于板孔，可结合带标签的捕获抗体。抗原或样本、捕获抗体及辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体加入后，在溶液中形成夹心复合物。在HRP催化下，四甲基联苯胺（TMB）使底物溶液由无色变蓝，加入终止液后变黄。溶液颜色深浅与结合蛋白量成正比。测量波长为450 nm，校正波长为630 nm。

三：需自备的实验器材

3.1 酶标仪（可读取450nm和630nm双波长）；

3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头；

3.3 洗板机（亦可手动洗板）；

3.4 EP管（用于稀释标准品及样本）；

3.5 吸水毛巾或滤纸（用于拍干）；

3.6 烧杯和量筒；

3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件（推荐四参数拟合方法），如：Origin，ELISA Calc等，也可使用Proteintech 公司数据分析网站：https: //www.ptgcn.com/products/elisa-kits/；

3.8 微孔板恒温振荡器。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

四：试剂盒组分及储存

英文名称	中文名称	规格	数量
Microplate	预包被酶标板 - 96 孔板	8孔 × 12条	1 块
Protein standard	标准品 - 冻干粉状 *	10000 pg/瓶	2 瓶
Capture antibody (100×)	捕获抗体浓缩液（100×） **	60 uL/管	1 管
Detection antibody, HRP-Conjugated (100×)	HRP 标记检测抗体浓缩液 （100×） **	60 uL/管	1 管
Sample Diluent PT 4B1	样本稀释液 PT 4B1	30 mL/瓶	1 瓶
Detection Diluent	抗体稀释液	15 mL/瓶	1 瓶
Wash Buffer Concentrate (20×)	浓缩洗涤液（20×）	30 mL/瓶	1 瓶
Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)	显色底物 TMB	12 mL/瓶	1 瓶
Stop Solution	终止液	12 mL/瓶	1 瓶
Extraction Reagent	裂解液	15 mL/瓶	1 瓶
Plate Cover Seals	封板膜		4张

储存条件：
1：未开启试剂盒可在2-8°C条件下存放6个月或者在-20°C条件下存放1年
2：已开启试剂盒可在2-8°C存放7天
3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃

* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，详见7.4部分，复溶过程避免产生气泡
** 开盖前请离心

五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.2 血浆: 可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 细胞上清: 收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20°C存放，避免反复冻融。

6.4 组织裂解液:

1) 使用预冷的1×PBS清洗组织，吸干水分后，用剪刀剪碎，加入适量的裂解液（加PMSF至裂解液中，终浓度为1 mM，每100 mg组织加入1 mL裂解液，不同样本需自行优化）；

2) 转移到预冷玻璃匀浆器中，匀浆约20-30下。匀浆效果与细胞类型和组织类型相关，不同细胞或组织所需的匀浆次数有所不同，需自行优化；

3) 匀浆20-30次后取约2-3 μL细胞或组织匀浆液滴在盖玻片上并在显微镜下观察，如见细胞核周晕环或完整的细胞形态，说明细胞仍完整。如果有70-80%的细胞均无核周晕环和完整细胞形态，说明细胞已经充分破碎，则进行下一步实验。否则，重新匀浆10-30次直到细胞至少90%已经破碎；

4) 细胞破碎后8000×g-10000×g离心5 min，分离上清，分装后-80°C存放，并用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）的配制：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37°C加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到1×洗涤液。

7.2 抗体混合液（1×）的配制：

开盖前瞬时离心，将捕获抗体和检测抗体稀释分别按1:100比例稀释到到同一管稀释液中，配制成检测所需的工作液。例如：将50 uL包被抗体浓缩液（100×）和50 uL检测抗体浓缩液（100×）加入 4900 uL抗体稀释液，混匀配制成1×抗体混合液。

7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，样本最低稀释比为1:2，即每个样本孔中最多加入样本原液25 uL。

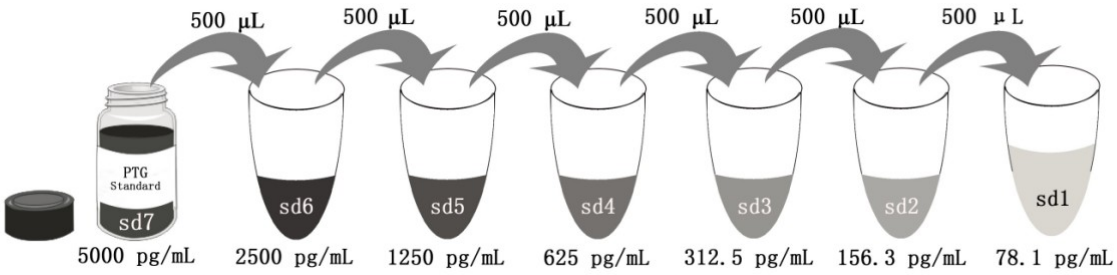
如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进一步稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：小鼠血清和血浆样本1:50或1:100稀释；细胞上清样本1:8或1:16稀释；组织裂解液样本1:128或1:256稀释； 样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

使用2 mL PT 4B1 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下:



Add # μL of Standard diluted in the previous step	—	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
# μL of Sample Diluent PT 4B1	**2000 μL**	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
	"sd7"	"sd6"	"sd5"	"sd4"	"sd3"	"sd2"	"sd1"

八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30 min（捕获抗体浓缩液和HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽；

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液50 μL，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本50 μL/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min 完成加样）；

8.3 每孔加50 μL 抗体混合液（1×）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育 1 h（若无恒温振荡器，此步骤建议37°C静置孵育2 h）；

8.4 洗涤

1） 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2） 洗涤液（1×）洗涤板条，每孔350-400 μL，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔；

8.5 显色：每孔加TMB显色液100 μL，恒温振荡器上37°C 400 rpm 孵育15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.6 终止：每孔加终止液100 μL，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免 接触终止液）

8.7 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度(OD值)。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

8.8 数据分析: 每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

操作流程如下：

加入 50 μL 标准品或样本至对应孔

每孔加入 50 μL 抗体混合液

37 °C　400 rpm 孵育 1h

每孔加入 400 μL Wash buffer 清洗 4 次

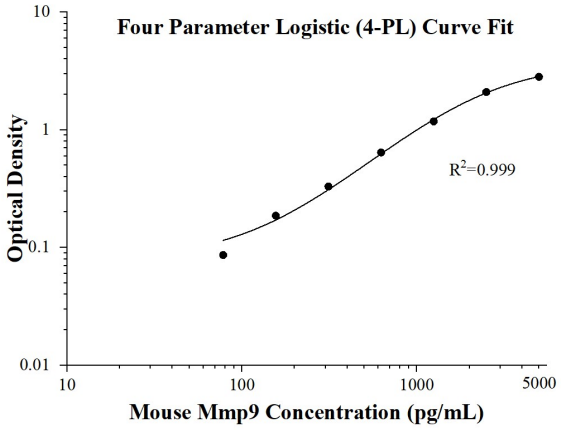
每孔加入 100 μL TMB

37 °C 400 rpm 避光孵育 15min

每孔加入 100 μL 终止液后读数

九：实验参数

9.1 参考标曲图



(pg/mL)	O.D	Average	Corrected
0	0.0055 0.0049	0.0052	-
78.1	0.0891 0.094	0.09155	0.08635
156.3	0.2027 0.1799	0.1913	0.1861
312.5	0.3352 0.3351	0.33515	0.32995
625	0.6457 0.6492	0.64745	0.64225
1250	1.1853 1.1854	1.18535	1.18015
2500	2.088 2.1107	2.09935	2.09415
5000	2.8243 2.837	2.83065	2.82545

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.2 精密度

板内精密度: 3个不同浓度的样本在板内重复测定 8 次;

板间精密度: 3个不同浓度的样本在板间重复测定 16 次。

板内精密度 (CV内)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	8	2,476.4	19.2	0.8
2	8	585.9	11.9	2.0
3	8	290.1	5.9	2.0

板间精密度 (CV 间)				
样本	数量	平均值 (pg/mL)	标准差	变异系数CV%
1	16	2,487.4	39.9	1.6
2	16	593.1	12.4	2.1
3	16	290.9	7.0	2.4

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行小鼠Mmp9的加标回收率实验，结果如下:

样本类型	稀释倍数	平均值 (%)	范围 (%)
小鼠血清	1:200	112	102-129
	1:400	102	100-105
细胞上清	1:32	105	104-106
	1:64	106	105-107
组织裂解液	1:512	104	102-105
	1:1024	107	106-108

9.4 样本值

小鼠血清 - 应用本试剂盒，检测小鼠血清样本中小鼠Mmp9的浓度。

样本类型	均值 (ng/mL)	范围 (ng/mL)
小鼠血清样本 (n=14)	97.4	44.8-164.5

细胞上清 - 在含有 10% 胎牛血清、50 μM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和100 μg/mL 硫酸链霉素的 RPMI 培养基中培养小鼠脾脏组织。收集细胞上清检测小鼠Mmp9含量，检测浓度为 16.9 **ng/mL**。

组织裂解液

	小鼠Mmp9 (ng/mL)	总蛋白量 (mg/mL)
小鼠肺组织裂解液	231.2	5.9

9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中小鼠Mmp9的灵敏度为 21.9 pg/mL。

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com

9.6 线性

用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

（小鼠血清样本预先稀释25倍，细胞上清样本预先稀释4倍，组织裂解液样本预先稀释64倍。）

		小鼠血清	细胞上清	组织裂解液
1:2	均值（%）	100	100	100
	范围（%）	-	-	-
1:4	均值（%）	106	80	94
	范围（%）	104-108	79-81	90-97
1:8	均值（%）	111	83	91
	范围（%）	109-113	74-92	89-93
1:16	均值（%）	112	80	83
	范围（%）	109-115	71-89	81-85

9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组小鼠Mmp9，加入50 ng/mL以下类似物或干扰物，无明显交叉反应。

Human:	Mouse:
MMP-1	Lipocalin-2/NGAL
MMP-2	MMP-2
MMP-3	
MMP-7	
MMP-8	

十：参考文献

1. Vandooren, Jennifer et al. Critical reviews in biochemistry and molecular biology vol. 48,3 (2013): 222-72.
2. Farina, Antonietta Rosella, and Andrew Reay Mackay. Cancers vol. 6,1 240-96. 27 Jan. 2014,
3. Yoshikawa, Akie Kimura et al. Journal for immunotherapy of cancer vol. 10,1 (2022): e003518.

USA: Proteintech@ptglab.com
UK & Europe: Europe@ptglab.com
China: Proteintech-CN@ptglab.com