

## 基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)抑制剂筛选试剂盒

产品编号	产品名称	包装
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

### 产品简介:

- 碧云天研发的基质金属蛋白酶3 (MMP-3)抑制剂筛选试剂盒(MMP-3 Inhibitor Screening Kit)是一种用荧光法简单、快速、高通量、高灵敏地筛选基质金属蛋白酶3 (Matrix Metalloproteinase-3, MMP-3)抑制剂的试剂盒。
- 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(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  $\alpha$ -chains, Aggrecan, Laminin, Fibronectin, Elastin, Casein,  $\alpha$ -1 Antitrypsin, Myelin Basic Protein, IL-1  $\beta$ , 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抑制剂筛选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。如果在反应体系中加入MMP-3蛋白酶的抑制剂(Inhibitor), 荧光的生成会被抑制, 荧光强度与抑制剂的抑制效果成反比, 这样就可以检测出MMP-3蛋白酶抑制剂的抑制效果。MCA的最大激发波长为325nm, 最大发射波长为393nm。

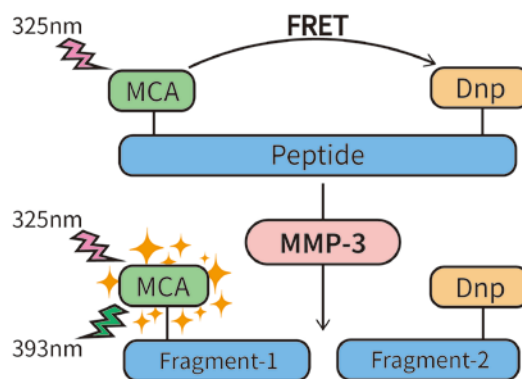


图 1. 基质金属蛋白酶 3 (MMP-3)抑制剂筛选试剂盒检测原理图。

- 本试剂盒抑制剂筛选结果真实可信。**本试剂盒中使用的全长重组人MMP-3蛋白是碧云天采用自主研发的PerfectProtein™哺乳动物蛋白表达技术平台纯化而来, 并已预先激活, 酶活性好。本试剂盒中使用的底物特异性好, 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。因此本试剂盒用于MMP-3抑制剂筛选时, 筛选获得的抑制剂更加真实可信。
- 本试剂盒稳定性好, 检测效果佳。**孵育1小时, 100%酶活性信号约为背景信号的5-7倍, 确保有足够的信号范围用于抑制剂

的筛选。通常在孵育1小时内，信号与孵育时间成正比，1小时后即趋于稳定。

- 本试剂盒中提供了 MMP-3 酶(MMP-3 Enzyme)、底物(Substrate)、阳性对照抑制剂(GM6001)，并且对 MMP-3 酶和底物的使用量进行了优化，不仅能检测出 IC<sub>50</sub> 很低的抑制剂，也能检测出 IC<sub>50</sub> 较高的抑制剂。本试剂盒提供的阳性对照 GM6001(别名 Galardin 或 Ilomastat) (SF4180)是一种广谱基质金属蛋白酶抑制剂，作用于 MMP-3、MMP-1、MMP-2、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-12、MMP-14 和 MMP-26，Ki 分别为 27nM、0.4nM、0.5nM、3.7nM、0.1nM、0.2nM、3.6nM、13.4nM 和 0.36nM。在本试剂盒中 GM6001 的 IC<sub>50</sub> 约为 60nM，实测数据会略有偏差。
- 对于96孔板，本试剂盒小包装P0339S可以进行100次检测，中包装P0339M可以进行500次检测。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0339S-1	Assay Buffer	30ml
P0339S-2	MMP-3 Enzyme	100μl
P0339S-3	Substrate	500μl
P0339S-4	GM6001 (0.1mM)	20μl
—	说明书	1 份

产品编号	产品名称	包装
P0339M-1	Assay Buffer	120ml
P0339M-2	MMP-3 Enzyme	500μl
P0339M-3	Substrate	1.25ml×2
P0339M-4	GM6001 (0.1mM)	100μl
—	说明书	1 份

#### 保存条件：

-20°C 保存，一年有效。其中 Substrate 须避光保存。

#### 注意事项：

- Assay Buffer、Substrate、GM6001 (0.1mM)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 Enzyme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。
- 确保加入样品后反应体系的pH值在7-8之间，或确保样品的pH值在7-8之间，否则可能会影响检测结果的信号值和稳定性。
- 待测抑制剂样品的溶剂可能会对检测产生干扰，推荐使用本试剂盒提供的Assay Buffer作为溶剂用于配制、稀释样品。如果样品必须用其它试剂配制、稀释，请进行一定的测试，并在对照孔中添加与样品等体积的溶剂以排除干扰。经测试，反应体系中DMSO、无水乙醇、甘油浓度达5%时对检测结果没有影响，但仍然建议进行一定的预实验并尽量降低DMSO、无水乙醇、甘油等溶剂在反应体系中的浓度。
- 尽管经测试本试剂盒中的MMP-3 Enzyme反复冻融5次对活性基本没影响，为取得良好的检测效果，建议第一次使用时适当分装保存。
- EDTA等金属螯合剂，对MMP-3酶活性有影响，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)。
- 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。

取适量待测抑制剂样品，用 Assay Buffer、DMSO 等适当的溶剂配制成适宜浓度的溶液，如果有必要可以配制成适当的浓度梯度待用。

##### 2. 阳性对照的准备。

本试剂盒提供的阳性对照抑制剂 GM6001 浓度为 0.1mM，配制在 DMSO 中，可以根据需要使用与待测抑制剂一样的溶剂稀释成所需浓度或浓度梯度。通常 GM6001 的 IC<sub>50</sub> 约为 30-60nM，使用本试剂盒时 GM6001 的抑制效果参考图 2。

##### 3. 样品测定。

- 根据样品数量(含相关对照)，参考下表配制适量的 Assay Reagent。注：MMP-3 Enzyme 微量吸取时要注意避免吸头吸附损失并吹打完全，加入 MMP-3 Enzyme 后需要注意充分混匀。

	1 sample	5 samples	10 samples	20 samples
Assay Buffer	89μl	445μl	890μl	1.78ml
MMP-3 Enzyme	1μl	5μl	10μl	20μl

- 参考下表，使用96孔黑板设置各组别，并按照下表依次加入检测试剂和样品。加入待测样品后，振荡混匀，确保混合充分。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。

	Blank Control	100% Activity Control	Inhibitor Control	Sample Group
Assay Buffer	90μl	-	-	-
Assay Reagent	-	90μl	90μl	90μl
GM6001 (0.1mM)	-	-	5μl	-
Sample Solvent	5μl	5μl	-	-
Sample	-	-	-	5μl

**注：** Sample Solvent 是指配制和稀释待测抑制剂所用的溶剂。如果特定的溶剂对于检测体系的干扰比较大，可以减少溶剂和待测样品的用量至 1-3μl，同时相应地增加 Assay Buffer 的用量。

- c. 各孔快速加入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，混匀操作可在多孔板振荡器上进行。
- d. 37°C避光孵育30-60分钟后使用多功能酶标进行荧光测定。激发波长为325nm，发射波长为393nm。当荧光读数偏低时，也可适当延长孵育时间至2小时。

**注：**也可在步骤 b 中将待测样品加入后 37°C 孵育 10-30 分钟，再将 Substrate 加入反应体系中。37°C 孵育 10-30 分钟再加入 Substrate 可能会降低抑制剂的 IC<sub>50</sub>。建议通过预实验确定未知抑制剂比较适合的孵育时间。

#### 4. 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<sub>空白对照</sub>、RFU<sub>100%酶活性对照</sub>、RFU<sub>阳性对照</sub>和RFU<sub>样品</sub>。RFU, Relative Fluorescence Unit。
- b. 计算每个样品的抑制百分率。计算公式如下：  
抑制率(%) = (RFU<sub>100%酶活性对照</sub> - RFU<sub>样品</sub>) / (RFU<sub>100%酶活性对照</sub> - RFU<sub>空白对照</sub>) × 100%
- c. 对于检测发现有效的抑制剂，通过检测该抑制剂的剂量效应就可以计算出该抑制剂的IC<sub>50</sub>。使用本试剂盒检测GM6001对于MMP-3的抑制作用的检测结果参考图2，Substrate直接加入反应体系中，然后孵育30分钟进行荧光测定，GM6001的IC<sub>50</sub>约为60nM。

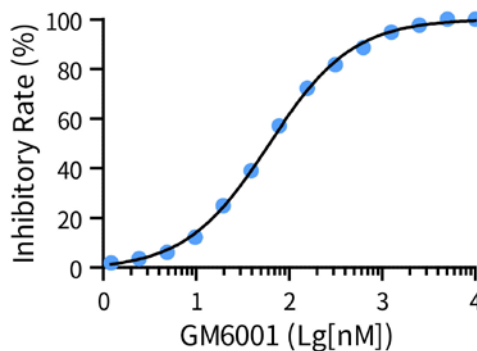


图2. 基质金属蛋白酶3(MMP-3)抑制剂筛选试剂盒检测GM6001的效果图。实际检测结果可能会因样品和检测条件等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

#### 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

Version 2021.08.06