

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-F083

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 330 nm，发射波长 450 nm)

Elabscience®神经氨酸酶(NA)荧光法测试盒

Neuraminidase (NA) Activity Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织中神经氨酸酶(NA)的酶活。

检测原理

神经氨酸酶(Neuraminidase, NA), 又称为唾液酸酶, 是可水解糖脂、低聚糖和糖蛋白末端唾液酸残基的外聚糖酶家族, 分布于病毒、细菌、真菌和脊柱动物细胞中。本测试盒的检测原理是通过检测单位时间内荧光物质生成速率, 计算样品中的神经氨酸酶活大小。

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	11 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.3 mL×1 支	0.6 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	500 μmol/L 标准品 (500 μmol/L Standard)	0.2 mL×1 支	0.4 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器: 荧光酶标仪(激发波长为 330 nm, 发射波长为 450 nm)

试剂: 生理盐水(0.9 % NaCl)

试剂准备

① 检测前，所有试剂平衡至25℃。

② 工作液的配制：

按试剂二：试剂一体积比=1：39混匀，按需配制，2-8℃避光可保存3天。

③ 50 μmol/L 标准品的配制：

按试剂三：双蒸水体积比=1：9混匀，充分溶解并混匀，得到 50 μmol/L 的标准品。按需配制，-20℃避光可保存3天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	10	20	25	30	35	40	50
50 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：9的比例进行匀浆，例如，0.1 g小鼠肺组织，加入0.9 mL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆。4℃，10000 ×g离心10 min后取上清待测，需留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.92-7.97 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%大鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肺组织	1-2 倍
10%小鼠心组织	不稀释		

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

- ① 标准孔:取 20 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中;
测定孔:取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向各孔中加入 180 μL 工作液。
- ③ 振板 5 s, 荧光酶标仪于激发波长 330 nm, 发射波长 450 nm 处检测各孔荧光值 F_1 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 检测各孔荧光值 F_2 , 标准曲线拟合只需要检测标准孔 F_2 即可。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
工作液(μL)	180	180
振板 5 s, 荧光酶标仪于激发波长 330 nm, 发射波长 450 nm 处检测各孔荧光值 F_1 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 检测各孔荧光值 F_2 , 标准曲线拟合只需要检测标准孔 F_2 即可。		

本试剂盒检测组织样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中神经氨酸酶(NA)活力计算公式:

定义: 37℃条件下, 每克样本蛋白每小时催化底物生成 1 μmol 的底物所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{神经氨酸酶(NA)活力 (U/gprot)} = (\Delta F - b) \div a \div t \div C_{pr} \times f$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔF: 样本测定孔绝对荧光值, $\Delta F = F_2 - F_1$

t: 反应时间, 1 h

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

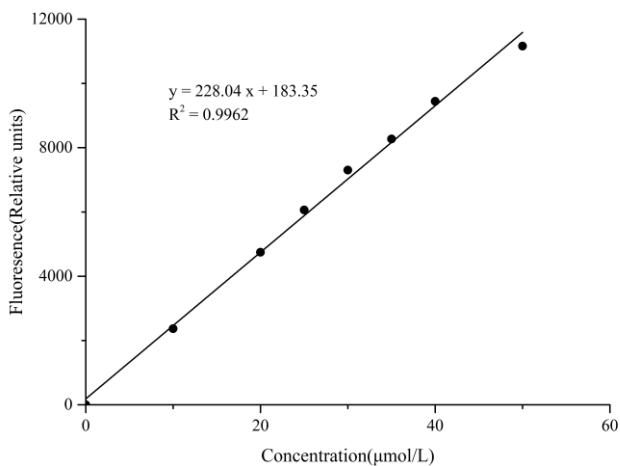
检测范围	1.92-7.97 U/L	批间差	5.0-10.0 %
灵敏度	1.92 U/L	批内差	2.2-5.0 %
稀释回收率	97-104 %		

2. 标准曲线 (数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	10	20	25	30	35	40	50
荧光值	16	2392	4751	6041	7246	8358	9537	10915
	9	2368	4762	6108	7385	8211	9376	11435
平均荧光值	13	2380	4757	6074	7315	8284	9456	11175
绝对荧光值	0	2367	4744	6061	7303	8271	9443	11162

② 绘制标曲(如下图):



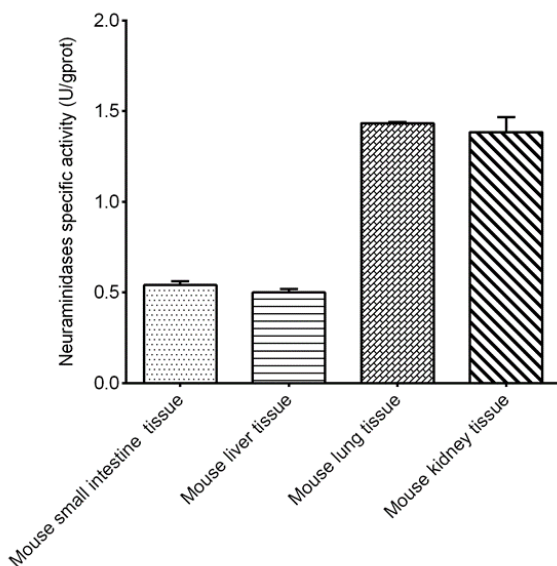
附录2 实例分析

例如检测小鼠肾组织(数据仅供参考):

取 20 μL 10% 小鼠肾组织匀浆上清液, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 219.94x + 57.537$, 测定孔平均荧光值 $F_1 = 1961$, 测定孔平均荧光值 $F_2 = 5324$, $\Delta F = F_2 - F_1 = 5324 - 1961 = 3363$, 10% 小鼠肾组织匀浆蛋白浓度为 10.86 gprot/L 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{神经氨酸酶活力(U/gprot)} &= (5324 - 1961 - 57.537) \div 219.94 \div 1 \div 10.86 \\ &= 1.38 \text{ U/gprot}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定小鼠小肠组织(10% 组织匀浆蛋白浓度 8.66 gprot/L, 不稀释, 加样量 20 μL)、测定小鼠肝组织(10% 组织匀浆蛋白浓度 12.75 gprot/L, 不稀释, 加样量 20 μL)、测定小鼠肺组织(10% 组织匀浆蛋白浓度 8.92 gprot/L, 不稀释, 加样量 20 μL)、测定小鼠肾组织(10% 组织匀浆蛋白浓度 10.86 gprot/L, 不稀释, 加样量 20 μL), 神经氨酸酶活性(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本荧光值过低	样本稀释倍数太大或孵育时间不够	选择合适稀释倍数,或延长反应时间

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。