天净沙系列

CAT#: 7-EC3.2.1.35-540

低温运输和保存

透明质酸酶活性测定试剂盒

（540 nm 分光光度法）

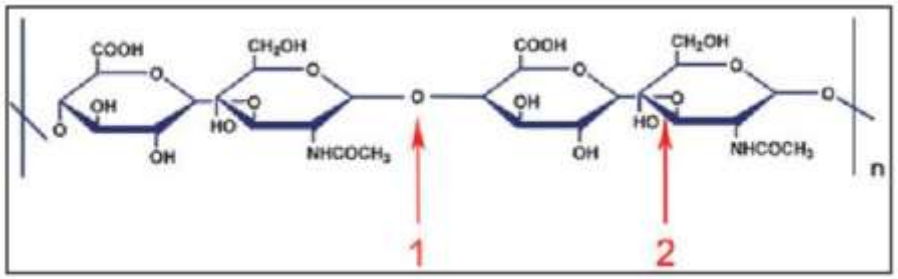
使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

透明质酸酶（Hyaluronidase，HAase）是一类在动物组织和细菌中广泛存在的酶。其中动物源性的透明质酸酶（EC3.2.1.35）水解透明质酸的β-1-4-糖苷键，产生还原性 N-乙酰-D-葡萄糖胺；水蛭源性的透明质酸酶（EC3.2.1.36）水解透明质酸的β-1-3-糖苷键，产生还原性葡萄糖醛酸；细菌源性的透明质酸酶（EC4.2.2.1）裂解（非水解）透明质酸糖链中的β-1-4-糖苷键，生成饱和二糖。三种透明质酸酶酶切透明质酸分子的位置分别如下图的 1（β-1-4-糖苷键）和 2（β-1-3-糖苷键）所示：



本产品的原理是透明质酸酶能产生还原性 N-乙酰-D-葡萄糖胺，而后者在适当的条件下，可以和底物反应产生在 540 nm 有光吸收的物质，通过检测这些物质而测定透明质酸酶的活性。本产品有如下特点：

1. 操作简单快捷。
2. 即开即用，用户不用单独准备各种试剂。
3. 专一性强，只能检测动物源性透明质酸酶，不能检测另外两种透明质酸酶。
4. 提供还原糖标准品。
5. 所能检测的线性范围在 19-130 U/mL 之间。
6. 适用于检测天然和重组透明质酸酶检测。
7. 本产品足够 100 次 1 mL 的比色皿检测和 400 次 0.2 mL 体积的 96 孔板检测。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用热封袋包装

成份	编号	规格	包装
透明质酸酶底物	7-EC3.2.1.35-540a	50 mL	60 mL 本色瓶
透明质酸酶底物显色液	7-EC3.2.1.35-540b	80 mL	125 mL 棕色瓶
还原糖标准品母液 (1 mg/mL)	7-EC3.2.1.35-540c	15 mL	15 mL 本色瓶
使用手册	7-EC3.2.1.35-540sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备物品	待测样本、样本悬浮缓冲液（如果不详，可用 PBS）、分光光度计，1 mL 比色皿
使用方法	**一、制作还原糖标准曲线样本** 1. 分别标记 7 个 1.5 mL 塑料离心管 1-7 号。 2. 在 7 号管中加入 2.6 mL 缓冲液（用户重悬测试样本所用的溶液，如果不详则用 PBS 替代。下同），1.4 mL 还原糖标准品母液(1 mg/mL)，共 4 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 350 μg/mL 的 7 号液。 3. 在 6 号管中加入 0.5 mL 缓冲液，3 mL 7 号液，共 3.5 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 300 μg/mL 的 6 号液。 4. 在 5 号管中加入 0.5 mL 缓冲液，2.5 mL 6 号液，共 3 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 250 μg/mL 的 5 号液。 5. 在 4 号管中加入 0.5 mL 缓冲液，2 mL 5 号液，共 2.5 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 200 μg/mL 的 4 号液。 6. 在 3 号管中加入 0.5 mL 缓冲液，1.5 mL 4 号液，共 2 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 150 μg/mL 的 3 号液。 7. 在 2 号管中加入 0.5 mL 缓冲液，1 mL 3 号液，共 1.5 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 100 μg/mL 的 2 号液。 8. 在 1 号管中加入 0.5 mL 缓冲液，0.5 mL 上 2 号液，共 1 mL，涡旋震荡混匀，得到终浓度为 50 μg/mL 的 1 号液。 9. 上述 1-7 号标准曲线样本放冰上待用。没有用完的不需要保存。 **二、酶切时生产还原糖** 10. 标记 N+1 个 1.5 mL 的塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照。 11. 按下表加入各成分： <table><tr><td></td><td>N 个样品管</td><td>阴性对照管</td></tr><tr><td>透明质酸酶底物</td><td>各 0.5 mL</td><td>0.5 mL</td></tr><tr><td>N 个待测样品(含酶)</td><td>各 0.5 mL</td><td>不加</td></tr><tr><td>自备缓冲液或 PBS</td><td>不加</td><td>0.5 mL</td></tr></table> 12. 37℃保温 30 分钟。 13. 将离心管放沸水中 5 分钟。此步可以灭活反应管中的透明质酸酶。 14. 常温 14000×g 离心 5 分钟沉淀蛋白成分。 15. 将 400 μL 上清转移到新的 1.5 mL 塑料离心管中待用，共 N+1 个管。

三、OD540 测定还原糖浓度

16. 上步得到的 N+1 个管（每管有 0.4 mL 酶切产物）可以直接使用，另外再标记 1-7 号 7 个管，用于还原糖标准曲线制备。

17. 在 N+1+7 个管中分别加入：

	N 个样品管	阴性对照管	1-7 号标曲管
N+1 个待测样品 不需要加	已各含 0.4 mL	已各含 0.4 mL	不加
1-7 号 还原糖标准品	不加	不加	各 0.4 mL（1 号到 1 号管，2 号到 2 号管……）
还原糖显色液	各 0.8 mL	0.8 mL	各 0.8 mL

18. 将离心管放沸水中 5 分钟以显色。

19. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 540 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

20. 得到的 OD 分别减去阴性对照的 OD 即得 N 个样本的 OD 和 7 个标准曲线样本的 OD。

三、数据分析

21. 以还原糖浓度为横轴，以 OD540 为纵轴，以 1-7 号还原糖标准曲线样本的数据用 excel 绘制标准曲线并得到计算公式。

22. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD540 数据计算出其所对应的还原糖浓度。根据透明质酸酶活性的定义（每分钟降解透明质酸后形成 1 nmol 还原糖所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。本测试所用还原糖的分子量为 180.16。

关联产品

乳酸脱氢酶活性测定试剂盒