



# 神经氨酸酶（唾液酸酶）荧光检测试剂盒说明书

（Neuraminidase（Sialidase）Fluorometric Assay Kit，货号：Y028-1-1）

## 【试剂组成】

试剂编号	试剂组成	规格装量（100T）	保存条件
R1	反应 Buffer	25 mL	-20℃避光保存
R2	底物蛋白	1 管	
R3	半乳糖氧化酶	1 管	
R4	荧光红试剂	1 管	
R5	辣根过氧化物酶 HRP	1 管	
R6	过氧化氢（H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ）	100 μL	
R7	神经氨酸酶	0.5 U	

注：试剂盒有效期 6 个月。

## 【产品简介】

神经氨酸酶（又称唾液酸酶）是一种很常见的酶，能够水解多糖链末端的唾液酸残基，通常会暴露出一个半乳糖残基。虽然哺乳动物体内也存在神经氨酸酶，但其主要表达于细菌和病毒等微生物中。

负链 RNA 流感病毒含有两种表面糖蛋白——血凝素（HA）和神经氨酸酶。神经氨酸酶被认为通过切割靶细胞受体上的唾液酸基团，在流感病毒入侵靶细胞及后续复制过程中发挥关键作用。这一作用可阻止病毒与靶细胞的进一步相互作用，并促进子代病毒颗粒从感染细胞中释放。此外，病毒颗粒上新合成的神经氨酸酶和 HA 可能含有唾液酸残基，这些残基可被神经氨酸酶切割以防止病毒自聚集。研究还表明，病毒通过神经氨酸酶对胎球蛋白（这些膜的主要成分）的水解作用，可增强其穿透粘膜基层的能力。这些关键功能使神经氨酸酶成为流感药物研发的重要靶点。

本神经氨酸酶（唾液酸酶）检测试剂盒提供了一种快速、单步操作且超灵敏的、适应性强的神经氨酸酶活性检测方法，用于定量生物体液中的神经氨酸酶以检测流感病毒，以及在药物研发中筛选神经氨酸酶活性抑制剂。以满足高通量筛选需求。该检测原理是利用荧光红试剂检测由半乳糖氧化酶氧化去唾液酸半乳糖产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，这是神经氨酸酶作用的最终结果。随后，在辣根过氧化物酶（HRP）存在下，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与荧光试剂按 1: 1 的化学比例反应，生成红色荧光氧化产物，其吸收和荧光发射最大值分别约为 571 nm 和 585 nm，该检测既可采用荧光法也可采用比色法进行。在以底物蛋白为底物的单纯检测体系中，对神经氨酸酶（唾液酸酶）可检测到低至 0.2 mU/mL 的神经氨酸酶水平。神经氨酸酶活性也可在生物样本（如血清）中检测。

## 【测定方法】

### 1、配制试剂储液

- ① 将一管荧光红试剂加入 100 μL DMSO（用户自备）溶解，配成荧光红储液：若未立即使用，储液应避光、冷冻保存于 ≤-20℃。
- ② 反应 Buffer 恢复至室温。4℃ 保存下可稳定数周。



- ③ 将一管 HRP 加入 50  $\mu\text{L}$  反应 Buffer 溶解，配成辣根过氧化物酶 HRP 储液。反应剩余溶液应分装并冷冻保存于  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。
- ④ 即用即配  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液：取 23  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  原液稀释至 977  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  中，配成 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液，应尽快使用。
- ⑤ 将一管半乳糖氧化酶加入 125  $\mu\text{L}$  反应 Buffer 溶解，配成半乳糖氧化酶储液。反应剩余溶液应分装成小份，并保存于  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。
- ⑥ 将一管底物蛋白加入 300  $\mu\text{L}$  反应 Buffer 溶解，配成底物蛋白储液。反应剩余溶液应分装成小份并储存于  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。
- ⑦ 将一管神经氨酸酶加入 100  $\mu\text{L}$  反应 Buffer 溶解，配成 5U/mL 神经氨酸酶储液，反应剩余溶液应分装成小份并储存于  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。

## 2、神经氨酸酶的检测

- ① 样品用反应 Buffer 进行适当稀释。可在预试验或首次试验中时连续稀释样本以确定最佳稀释倍数。每个样本取 50  $\mu\text{L}$  移入 96 孔板的各孔中。应设平行复孔。  
**注：**样本浓度在最终反应体积中将降低一半。
- ② 将 50  $\mu\text{L}$  反应 Buffer 加入空白孔中，作为阴性对照孔。应设平行复孔。
- ③ 将神经氨酸酶储液用反应 Buffer 稀释 50 倍成为 0.1U/mL，取 50  $\mu\text{L}$  移入孔中，作为神经氨酸酶阳性对照孔。应设平行复孔。  
**注：**提供的神经氨酸酶仅作为检测的阳性对照，不应作为酶活性的定量标准。
- ④ 将 20mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液用反应 Buffer 稀释 2000 倍至 10  $\mu\text{M}$  工作液，取 50  $\mu\text{L}$  工作液移入微孔中作为  $\text{H}_2\text{O}_2$  阳性对照孔。应设平行复孔。
- ⑤ 配制 2 X 反应工作液，具体组成如下：

2 X 反应工作液的组成	加入体积
反应 Buffer	4.59 mL
荧光红储液	50 $\mu\text{L}$
HRP 储液	10 $\mu\text{L}$
半乳糖氧化酶储液	100 $\mu\text{L}$
底物蛋白储液	250 $\mu\text{L}$
合计体积（100 孔 50 $\mu\text{L}$ /孔）	5 mL

- ⑥ 在样本孔和各个对照孔中每孔加入 50  $\mu\text{L}$  上述反应工作液，开始反应。
- ⑦ 在  $37^{\circ}\text{C}$  避光条件下孵育 30 分钟或更长时间，其间进行连续（非终点）检测，可在多个时间点（如间隔 5 min）测量荧光或吸光度，以追踪反应动力学。
- ⑧ 酶标仪在 530–560 nm 激发波长范围内进行荧光或吸光度测量，并在约 590 nm 处检测发射光或约 560 nm 处检测吸光度。
- ⑨ 每孔数值减去阴性对照值以校正背景荧光或吸光度。

**注：**二硫苏糖醇（DTT）和 2-巯基乙醇等硫醇的最终浓度不应超过 10  $\mu\text{M}$ 。