

# 人透明质酸酶 1 酶联免疫吸附测定试剂盒

产品编号：MA1089 规格：96 次

## 产品内容

产品组成	体积/数量
人 HYAL1 预包被板	8 孔条×12 个
样品稀释液	30 mL
重组人 HYAL1 标准品(冻干)	2 支(10 ng/支)
生物素标记人 HYAL1 抗体	130 μL(效价 1:100)
抗体稀释液	12 mL
酶复合物(HRP 标记的链霉亲和素)	130 μL(效价 1:100)
酶复合物稀释液	12 mL
浓缩洗涤液(25×)	30 mL
显色剂 TMB	10 mL
终止液	10 mL
封板胶纸	4 张

## 产品简介

本试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法，用于检测样品中人 HYAL1 的浓度。人 HYAL1 捕获抗体已经预包被于酶标板上，当加入样品或标准品时，其中的人 HYAL1 会与捕获抗体结合，而其它游离成分则会通过洗涤被除去。接着，再加入生物素标记的人 HYAL1 抗体后，抗人 HYAL1 抗体与人 HYAL1 接合，形成夹心的免疫复合物，其它游离成分则通过洗涤被除去。随后加入酶复合物，生物素与酶复合物特异性结合，这样酶复合物上的 HRP 就与夹心的免疫复合物连接起来，而其它游离成分则通过洗涤被除去。最后加入显色剂，若样品中存在人 HYAL1，则会形成免疫复合物，其上连接的 HRP 会催化无色的显色剂氧化生成蓝色物质，而后加入终止液，最终产物呈黄色。通过酶标仪检测，读取 450 nm 处的 OD 值，人 HYAL1 浓度与 OD450 值之间呈正比，通过检测标准品绘制标准曲线，对照未知样品中 OD 值，即可计算出样品中人 HYAL1 的浓度。

透明质酸酶 1 (Hyaluronidase 1, HYAL1)，又称透明质酸氨基葡聚糖酶 1，是一种由 HYAL1 基因编码、定位于溶酶体及细胞外基质的糖蛋白，属于糖苷水解酶 56 家族，在降解透明质酸 (HA)、调控组织水合度、细胞迁移及免疫监视中发挥核心生理作用。

HYAL1 在多种疾病中扮演关键角色，包括特发性肺纤维化 (IPF)、膀胱癌、食管癌、结直肠癌及黏多糖贮积症 IX 型。HYAL1 通过降解内皮糖萼导致脉络膜血管异常渗漏；在肿瘤微环境中，HYAL1 介导的 HA 片段化可增强 PD-L1 表达，阻断 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润，从而间接影响免疫检查点抑制剂疗效。



## 产品参数：

检测范围	62.5 pg/mL~4,000 pg/mL
敏感性	18 pg/mL
特异性	系统和其它因子无交叉反应
样本类型	人血清、血浆、体液、组织匀浆或细胞培养上清

## 使用方法

### (一) 样品制备

1.根据样品种类选择相应的处理方法：

- (1) 细胞上清：将细胞培养上清液100~500×g离心5min，去除悬浮物后即可。
- (2) 血清样品：将全血在室温下静置0.5~2h，待其自然凝固并析出血清后，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血清需置于冰上待用，请勿在其中添加任何防腐剂或抗凝剂；
- (3) 血浆样品：使用EDTA对全血进行抗凝处理后，混合均匀置于冰上，离心取黄色上清即可(4℃，1,000~2,000×g，10min)，注意请勿吸取沉淀，制备好的血浆需置于冰上待用；
- (4) 组织匀浆/体液：离心去除沉淀即可。

注意：

- ①若待测样品无法及时检测，样品制备完成后，请分装冻存于-20℃，避免反复冻融；
- ②请保证待测样品清澈透明，检测前如发现样品中有悬浮物，需通过离心去除；
- ③为了保证检测结果准确，请勿使用溶血、黄疸、高血脂或污染的样品。

### 2.稀释样品

查阅相关文献，预估样品中待测因子的含量，从而确定适当的稀释倍数，使稀释后样品中待测因子的浓度处于ELISA试剂盒的最佳检测范围。根据待测因子含量的不同，分别采取不同的稀释方案：

- (1) 待测因子含量在 40~400 ng/mL 范围内，一般按 1:100 稀释，即向 297 μL 样品稀释液中加入 3 μL 样品；
- (2) 待测因子含量在 4~40 ng/mL 范围内，一般按 1:10 稀释，即向 225 μL 样品稀释液中加入25 μL 样品；
- (3) 待测因子含量在 62.5~4,000 pg/mL 范围内，一般按 1:2 稀释，即向 100 μL 样品稀释液中加入 100 μL 样品；
- (4) 待测因子含量≤62.5 pg/mL，样品一般无需稀释。

以上方案仅供参考，实验中请详细记录样品的稀释方法。

### (二) 检测准备工作

3.试剂盒自4℃冰箱取出后，请置于室温平衡20min；如从-20℃取出，各组分需彻底融化后再平衡20min；检测完成后，剩余试剂请及时置于4℃或-20℃保存。



4. 将浓缩洗涤液(25×)用双蒸水或去离子水稀释成1×洗涤液。
5. 重组人 HYAL1 标准品的稀释和使用(在使用前2h内准备, 室温操作, 请严格控制在25~28°C)
  - (1) 配制 10 ng/mL 标准品: 取 1 mL 样品稀释液加入标准品管内, 盖好后静置 15 min 以上, 然后反复颠倒 / 搅动以助溶解;
  - (2) 配制 4,000 pg/mL 标准品: 取 400 μL 10 ng/mL 的标准品加入有 600 μL 样品稀释液的 EP 管中, 混匀, 做上标记;
  - (3) 按下表将 4,000 pg/mL 标准品用样品稀释液进行倍比梯度稀释。(最高浓度为 4,000 pg/mL, 将标准品稀释液作为浓度 0 pg/mL。)

管号	稀释液用量(μL)	复溶后标准品用量(μL)	标准品的最终浓度(pg/mL)
A	0	1000	4,000
B	300	300(从A管取出)	2,000
C	300	300(从B管取出)	1,000
D	300	300(从C管取出)	500
E	300	300(从D管取出)	250
F	300	300(从E管取出)	125
G	300	300(从F管取出)	62.5
H	300	0	0

注意: 标准品复溶加样后, 剩余部分请丢弃。

6. 准备生物素标记人 HYAL1 抗体工作液 (需在使用前 1 h 内准备)
  - (1) 按每孔需添加100μL抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200μL);
  - (2) 按每孔需添加100μL抗体工作液, 计算其总用量(为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200μL);
  - (3) 按1μL生物素标记人 HYAL1 抗体添加99μL抗体稀释液的比例配制工作液, 轻轻混匀。

## 7. 准备酶复合物工作液 (需在使用前 1 h 内准备)

- (1) 按每孔需添加 100 μL 酶复合物工作液, 计算其总用量 (为弥补操作中的损耗, 需多配制100~200 μL) ;
- (2) 按 1 μL 酶复合物 添加 99 μL 酶复合物稀释液 的比例配制工作液, 轻轻混匀。

## (三) 检测流程

8. 通过计算确定一次实验所需的板条数, 取出所需板条放置于框架内, 多余的板条请放回铝箔袋密封, 保存于4°C或-20°C。

注意:

- ①标准品和样品建议做双复孔检测;
- ②每次实验均需绘制标准曲线。

9. 将用样品稀释液稀释后的样品和不同浓度标准品(100μL/孔)分别加入相应孔中, 用封板胶纸封住反应孔, 37°C孵育90min。

注意:

- ①请查阅相关文献确定样品中待检测蛋白的大致浓度, 若其大于本试剂盒标准曲线的最大标准品浓度, 请将样品适当稀释后再进行检测;



②整个加样过程不宜超过10min，否则可能会影响检测结果。

10.甩去酶标板内液体，无需洗板，将板倒扣在吸水纸上拍干。

11.加入稀释后的生物素标记人 HYAL1 抗体工作液(100 $\mu$ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃孵育60min。

12.洗板5次，每孔1×洗涤液用量为300 $\mu$ L，注入与吸出间隔15~30s，洗完后将板倒扣在吸水纸上拍干。

**注意：洗涤过程至关重要，洗涤不充分会导致结果产生较大误差。**

13.加入稀释后的酶复合物 (100  $\mu$ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，37℃避光孵育 30 min；

14.洗板 5 次，方法同步骤 12；

15.加入显色剂 TMB(100  $\mu$ L/孔)，用封板胶纸封住反应孔，避光 37℃反应 10~25 min。

**注意：**

① 在保存和使用时，请勿将 TMB 接触氧化剂和金属；

② 因实验室条件差异，最佳显色时间会有所不同，反应充分时肉眼可见标准品的前 3~4 孔有明显的梯度蓝色。

16.加入终止液(100 $\mu$ L/孔)，混匀后即刻使用酶标仪测量OD450，同时设定540nm或570nm作为校正波长，即可计算得到校正吸光度值(OD450-OD540或OD450-OD570)；

**注意：读取OD值建议在10min内完成。**

#### (四) 数据分析

17.绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标，OD值作纵坐标，利用计算机软件作四参数逻辑(4-PL)曲线拟合创建标准曲线，通过样品的OD值即可在标准曲线上计算出其相应浓度。

**注意：**

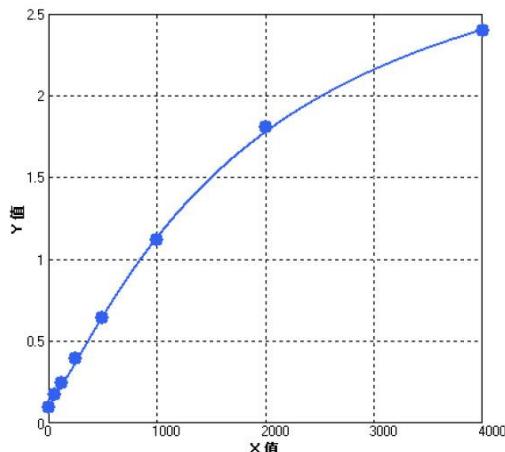
①复孔OD值在20%的差异范围内结果才有效，复孔OD值取平均后可作为测量值；

②若样品OD值高于标准曲线上限，应适当稀释后重测，计算浓度时应乘以稀释倍数。

#### 标准曲线范例

人 HYAL1 参考标准曲线

标准品浓度	O.D.
0 pg/mL	0.094
62.5 pg/mL	0.177
125 pg/mL	0.248
250 pg/mL	0.395
500 pg/mL	0.640
1,000 pg/mL	1.115
2,000 pg/mL	1.810
4,000 pg/mL	2.394



**注意：本图仅供参考，应以同次试验标准品所绘标准曲线计算样品含量。**



## 保存条件

2~8℃保存，自生产之日起6个月有效；长期储存请置于-20℃，自生产之日起12个月有效。

## 注意事项

- 1.浓缩洗涤液低温情况下可能会出现结晶，请水浴加热使结晶完全溶解后再配制工作液；
- 2.严禁混用不同批号试剂盒的组分；
- 3.加样过程请避免产生气泡，实验操作过程中一定要保证试剂充分混匀，否则会使结果产生较大误差；
- 4.说明书中提到的室温条件，请严格控制在25~28℃；
- 5.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 6.本产品仅限科研使用。

S251001

