

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG)试剂盒说明书 (货号: BN72083 分光法 24 样)

一、产品简介:

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG, EC 3.2.1.52)是溶酶体中的一种酸性水解酶,广泛存在于各种组织、体液和细胞中,该酶活性变化与机体某些病理状态密切相关。

NAG 分解 4-硝基酚-β-N-乙酰氨基葡萄糖生成对-硝基苯酚(PNP),在 415nm 处检测该产物的升高速率,来计算 NAG 活力大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加入 2.1mL 蒸馏水,充分溶解备用,用不完的试剂仍-20℃保存;
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 35mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲,则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、台式离心机、水浴锅或恒温培养箱、可调式移液器。

四、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本的制备:

① 组织样本:取约 0.1g 组织(水分充足的样本取 0.5g),加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆。15000rpm, 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本,按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 提取。

② 细菌或细胞:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 500 万细菌或细胞,加入 1mL 提取液,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);15000 rpm 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】若增加样本,可以按照细菌或细胞数量(10⁴个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 提取。

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 415nm,蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	80	
蒸馏水		80
试剂二	100	100
迅速混匀, 37℃保温 30min		
试剂三	600	600

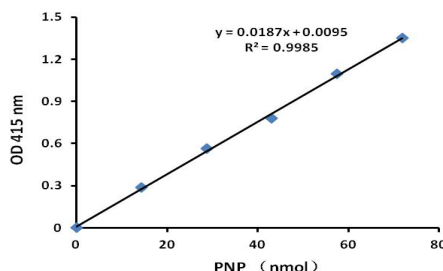
混匀，取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中，415nm 处测定吸光值 A，
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管需设一个对照管）。

【注】：1.若 ΔA 在零附近徘徊，可延长 37℃ 孵育时间 T（如增至 1 小时或更长），或增加加样体积 V1（如增至 50μL，则试剂二相应减少）或增加取样质量 W（如增至 0.2g）。则改变后的 T 和 V1 和 W 需代入公式重新计算。

2.若 A 测定大于 1.5 或 ΔA 大于 1.5，可缩短 37℃ 孵育时间 T（如减至 10min 或更短）或减少加样体积 V1（如减至 10μL，则试剂二相应增加）。则改变后 T 和 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0187x + 0.0095$ ；x 为标准品质量（nmol），y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活性单位。

NAG 活性(nmol/min/mg prot)=[$(\Delta A - 0.0095) \div 0.0187$] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 89.1 \times (\Delta A - 0.0095) \div Cpr$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活性单位。

NAG 活性(nmol/min/g 鲜重)=[$(\Delta A - 0.0095) \div 0.0187$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 89.1 \times (\Delta A - 0.0095) \div W$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义一个酶活单位。

NAG 活性(nmol/min/ 10^4 cell)=[$(\Delta A - 0.0095) \div 0.0187$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.18 \times (\Delta A - 0.0095)$

5、按液体体积计算：

单位定义：每毫升样本每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚（PNP）定义为一个酶活性单位。

NAG 活性(nmol/min/mL)=[$(\Delta A - 0.0095) \div 0.0187$] $\div V1 \div T = 89.1 \times (\Delta A - 0.0095)$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，20μL=0.02mL；

W----样本质量，g；

500----细胞或细菌总数，500 万；

T----反应时间，30min；

PNP 对分子质量----139.11。

Cpr----样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 在 EP 管加入：20μL 标准品+180μL 试剂二+600μL 试剂三，混匀，取 200μL 至 96 孔板中，于 415nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。