

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: BP10286F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

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 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 3. 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℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、所需的仪器和用品:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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 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	

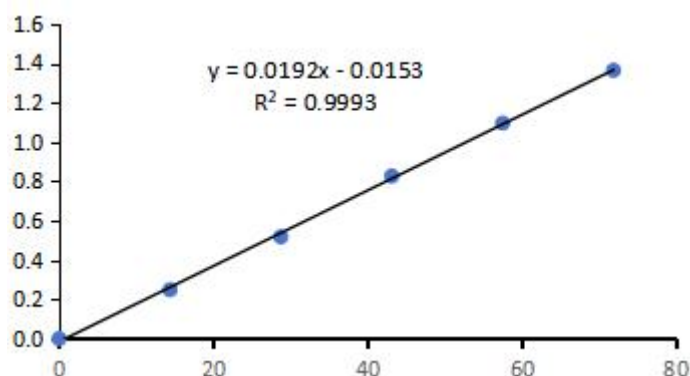
蒸馏水		80
试剂二	100	100
迅速混匀，37℃保温 30min		
试剂三	600	600
混匀，取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中，415nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【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 50 μ L，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 10 μ L，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： $y = 0.0192x - 0.0153$ ；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)=[$(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192$] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 86.8 \times (\Delta A + 0.0153) \div Cpr$

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)=[$(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192$] $\div (W \times V1 \div V) \div T = 86.8 \times (\Delta A + 0.0153) \div W$

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)=[$(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.174 \times (\Delta A + 0.0153)$

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)=[$(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192$] $\div V1 \div T = 86.8 \times (\Delta A + 0.0153)$

V----加入提取液体积，1mL；

V1----加入反应体系中样本体积，20 μ L=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 向标准品 EP 管里面加入 1ml 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓

度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂二	180	180
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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		