

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶（NAG）试剂盒说明书

（货号：BP10286W 微板法 48 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.2mL 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 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 65mL×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、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

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，可以按照组织质量（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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 415nm。
② 在 EP 管中依次加入：

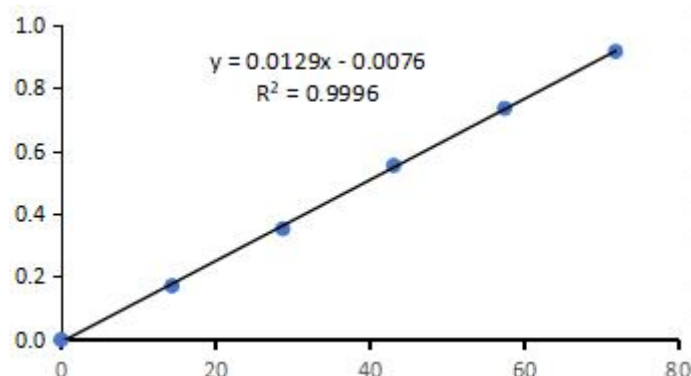
试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	20	20

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 200μL 至 96 孔板中，415nm 处测定吸光值 A， ΔA=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 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： $y = 0.0129x - 0.0076$ ；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)=[(ΔA+0.0076) ÷ 0.0129] ÷ (V1×Cpr) ÷ T=129.2×(ΔA+0.0076) ÷ 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)=[(ΔA+0.0076) ÷ 0.0129] ÷ (W×V1÷V) ÷ T=129.2×(ΔA+0.0076) ÷ 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/10⁴cell)=[(ΔA+0.0076) ÷ 0.0129] ÷ (500×V1÷V) ÷ T=0.258×(ΔA+0.0076)

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)=[(ΔA+0.0076) ÷ 0.0129] ÷ V1 ÷ T=129.2×(ΔA+0.0076)

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 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 200μL 至 96 孔板中，于 415nm 下读取吸光值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		