

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG)试剂盒说明书 (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。

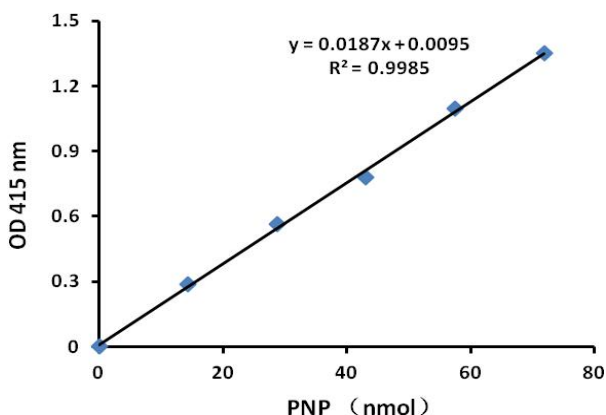
② 在 EP 管中依次加入:

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,		

$$\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 对照 (每个测定管需设一个对照管)}。$$

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，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 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：20 μ L 标准品+180 μ L 试剂二+600 μ L 试剂三，混匀，取 200 μ L 至 96 孔板中，于 415nm 下读取吸光值。
- 4 根据结果制作标准曲线。