

N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (NAG) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10671

规格: 50T/24S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解备用; 可-20°C分装保存, 避免反复冻融, -20°C可保存 2 周;
- 2、标准品: 5 μmol/mL 对硝基苯酚溶液, 临用前用蒸馏水将标准品稀释 8 倍得 0.625 μmol/mL 的标准溶液。

产品说明:

N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.52, N-acetyl-β-D-glucosidase, NAG) 广泛分布于各种组织中, 是一种细胞内溶体酶, 测定NAG活性可用于肾小管间质性肾炎、尿路感染、糖尿病肾病综合症、高血压肾病、肾移植后的排异反应和肾病综合症的早期诊断。

NAG分解N-β-乙酰氨基葡萄糖苷生成对-硝基苯酚, 后者在400nm有最大吸收峰, 通过测定400nm下吸光度的变化来计算NAG活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、天平、台式离心机、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管、冰和蒸馏水。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

- 1、组织: 按照组织质量 (g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 进行冰浴匀浆。15000g, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞: 按照细胞数量 10⁴ 个: 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例, 建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min) 然后 15000g, 4°C, 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 等液体: 直接测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上, 调节波长至400nm, 蒸馏水调零。
- 2、操作表 (在1.5mL离心管中依次加入下列试剂) :

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
试剂一	300	300	300	300
试剂二	150	-	-	-
蒸馏水	-	150	150	200
标准液	-	-	50	-
样本	50	50	-	-
37°C反应30min				
试剂三	1000	1000	1000	1000

混匀后室温放置 2min, 测定 400nm 的吸光度, 分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。

三、NAG活性计算

1、按蛋白浓度计算

活力单位定义: 每mg蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAG (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算

活力单位定义: 每g样本在反应体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAG (U/g 质量)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

3、按细胞数量计算

活力单位定义: 每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAG (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

活力单位定义: 每毫升液体在反应体系中每分钟催化生成1nmol对硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\text{NAG (U/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标: 标准溶液浓度: $0.625 \mu\text{mol/mL}$; V样: 加入的样本体积, 0.05mL ; V样总: 提取液体积, 1mL ; Cpr: 上清液蛋白浓度, mg/mL ; T: 反应时间, 30min ; 细胞数量: 以万计; W: 样本质量, g; 1000: 换算系数, $1 \mu\text{mol} = 1000 \text{nmol}$ 。

注意事项:

吸光度若大于1时, 建议将样本用提取液稀释后进行测定。

实验实例:

1. 取 0.1g 大鼠脾脏组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。 15000g , 4°C 离心 10min , 取上清稀释 5 倍, 按照测定步骤操作, 测定计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管= $0.798-0.042=0.756$, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管= $0.364-0.006=0.358$, 按样本质量计算得:

$$\text{NAG (U/g 质量)} = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 5 \text{ (稀释倍数)} = 2199.3687 \text{ U/g 质量。}$$

2. 取 0.1g 玉兰, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。 15000g , 4°C 离心 10min , 取上清, 按照测定步骤操作, 测定计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管= $0.543-0.120=0.423$, ΔA 标准=A 标准管-A 空白管= $0.364-0.006=0.358$, 按样本质量计算得:

$$\text{NAG (U/g 质量)} = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 246.120 \text{ U/g 质量。}$$

3. 取兔血清直接检测，按照测定步骤操作，测定计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.542 - 0.348 = 0.194$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}} = 0.364 - 0.006 = 0.358$ ，按液体体积计算得：
 $\text{NAG (U/mL)} = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 11.2878 \text{ U/mL}$ 。