

# N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (NAG) 活性检测试剂盒说明书

微量法

货号: AC10672

规格: 100T/48S

**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 60 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 20 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 2 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/酶标仪、天平、台式离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP管。

**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 10<sup>4</sup> 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 (率 300w, 超声 3 s, 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/酶标仪预热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	60	60	60	60
试剂二	30	-	-	-
37°C下预热5min				
蒸馏水	-	30	30	40
标准液	-	-	10	-
样本	10	10	-	-
37°C反应30min				
试剂三	200	200	200	200

混匀后室温放置 2min，吸取 200μL 于微量玻璃比色皿或者 96 孔板中测定 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  $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

### 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。

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

#### 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。

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

#### 3、按细胞数量计算

活力单位定义：每10<sup>4</sup>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。

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

#### 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。

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

C标：标准溶液的浓度：0.625μmol/mL；V样总：提取液体积，1mL；V样：加入的样本体积，0.01mL；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，1μmol=1000nmol。

#### 注意事项：

吸光度若大于2时，建议将样本用提取液稀释后进行测定。

#### 实验实例：

- 称取 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，使用 96 孔板测定计算  $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管} = 0.582 - 0.067 = 0.515$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管} = 0.268 - 0.047 = 0.221$ ，按样本质量计算得：

$$NAG (U/g \text{ 质量}) = 20.83 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times 5 (\text{稀释倍数}) = 2427.02 U/g \text{ 质量}。$$

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, 使用 96 孔板测定计算  $\Delta A$  测定=A 测定管-A 对照管=0.405-0.112=0.293,  $\Delta A$  标准=A 标准管-A 空白管=0.268-0.047=0.221, 按样本质量计算得:

$$\text{NAG (U/g 质量)} = 20.83 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 276.162 \text{ U/g 质量。}$$

3. 取兔血清直接检测, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测定计算  $\Delta A$  测定=A 测定管-A 对照管=0.368-0.246=0.122,  $\Delta A$  标准=A 标准管-A 空白管=0.268-0.047=0.221, 按液体体积计算得:

$$\text{NAG (U/mL)} = 20.83 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} = 11.4989 \text{ U/mL。}$$