

## N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶（NAG）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TDX034 微板法 48 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 60mL×1 瓶 | 4℃保存   |   |
| 试剂一  | 粉剂 1 支      | -20℃保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 4.2mL 蒸馏水，充分溶解备用，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℃保存   | 若重新做标曲，则用到该试剂                                     |

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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，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（10<sup>4</sup>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 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 200μL 至 96 孔板中，415nm 处测定吸光值 A <sub>1</sub> |     |     |

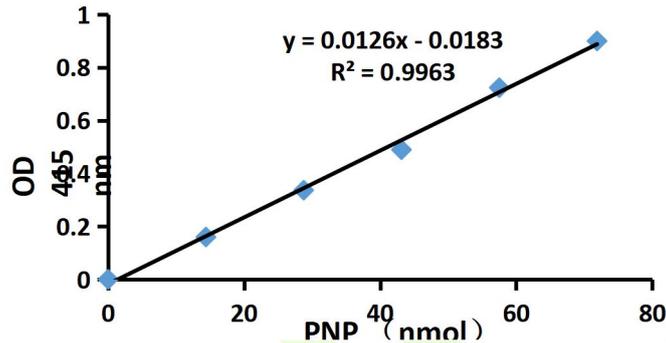
$\Delta A=A$  测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。

【注】: 1.若 $\Delta A$  在零附近徘徊,可延长 37°C 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 $\mu$ 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 $\Delta A$  大于 1.5,可缩短 37°C 孵育时间 T (如减至 10min 或更短)或减少加样体积 V1 (如减至 10 $\mu$ 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:  $y = 0.0126x - 0.0183$ ; x 为标准品质量 (nmol), y 为吸光值 $\Delta A$ 。



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)=[ $(\Delta A+0.0183) \div 0.0126$ ] $\div (V1 \times Cpr) \div T=132.3 \times (\Delta A+0.0183) \div Cpr$

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)=[ $(\Delta A+0.0183) \div 0.0126$ ] $\div (W \times V1 \div V) \div T=132.3 \times (\Delta A+0.0183) \div W$

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)=[ $(\Delta A+0.0183) \div 0.0126$ ] $\div (500 \times V1 \div V) \div T=0.26 \times (\Delta A+0.0183)$

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)=[ $(\Delta A+0.0183) \div 0.0126$ ] $\div V1 \div T=132.3 \times (\Delta A+0.0183)$

V----加入提取液体积, 1mL; V1----加入反应体系中样本体积, 20 $\mu$ 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 $\mu$ L 标准品+180 $\mu$ L 试剂二+600 $\mu$ L 试剂三, 混匀, 取 200 $\mu$ 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。

