

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

(货号: ADS-F-TDX034 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

### 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 1 瓶      | -20℃保存 | 1. 开盖前注意使粉剂落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 2.1mL 蒸馏水, 充分溶解备用;<br>3. 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℃避光保存 | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。             |

### 三、所需的仪器和用品:

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

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( $10^4$ 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  |     |

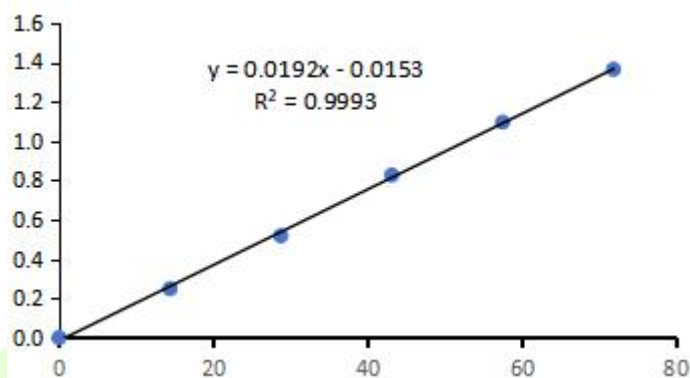
|                                                                                                       |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 蒸馏水                                                                                                   |     | 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,<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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℃ 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  $\Delta A$  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:  $y = 0.0192x - 0.0153$ ; 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。

$\text{NAG 活性 (nmol/min/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 86.8 \times (\Delta A + 0.0153) \div \text{Cpr}$

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。

$\text{NAG 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192] \div (W \times V1 \div V) \div T = 86.8 \times (\Delta A + 0.0153) \div W$

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。

$\text{NAG 活性 (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.174 \times (\Delta A + 0.0153)$

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。

$\text{NAG 活性 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A + 0.0153) \div 0.0192] \div V1 \div T = 86.8 \times (\Delta A + 0.0153)$

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<br>mg/mL                                      | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 标品稀释液<br>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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。 |     |              |