

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

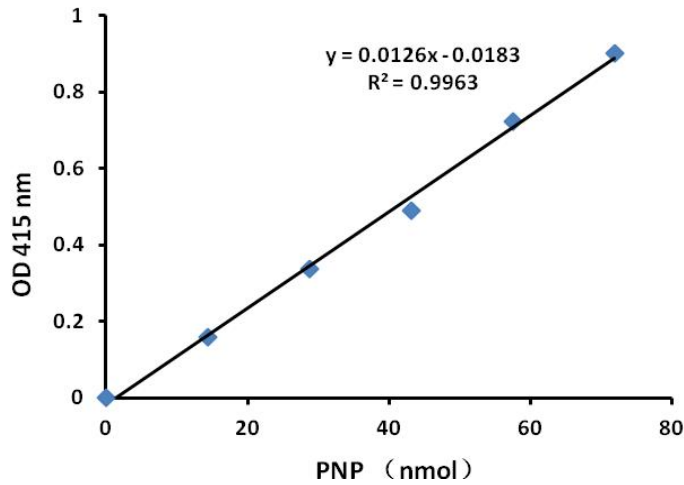
① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 415nm。

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， ΔA=A 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0126x - 0.0183$ ； 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)=[$(\Delta A + 0.0183) \div 0.0126$] $\div (V1 \times Cpr) \div T = 132.3 \times (\Delta A + 0.0183) \div Cpr$

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 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。