

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: G0532W 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 (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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 415nm。

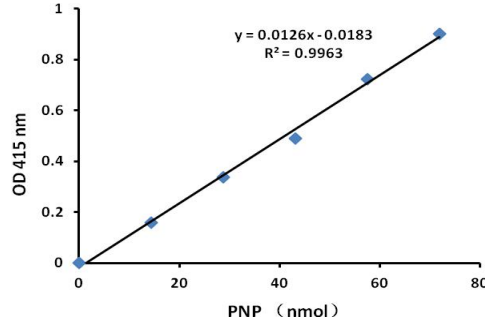
② 在 EP 管中依次加入:

| 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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。 | | |

- 【注】: 1.若 ΔA 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 μ 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 ΔA 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 μ 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 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。