

组织及血液 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (NAG) 活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC5-M48	组织及血液N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (NAG) 试剂盒	48T	微量法

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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃ 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℃分装保存，避免反复冻融，-20℃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。

操作步骤：

一、样本处理

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℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 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℃, 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 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管, ΔA 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。

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

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。

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

3、按细胞数量计算

活力单位定义: 每 10^4 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。

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

$$= 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{细胞数量}$$

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。

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

$$= 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

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。