

β-N-乙酰葡萄糖苷酶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
AYHD9-M48	β-N-乙酰葡萄糖苷酶活性检测试剂盒	48T	微量法
AYHD9-M96		96T	

一、测定意义：

β-N-乙酰葡萄糖苷酶为溶酶体中一种重要的酶，可作为肾损伤一个极为灵敏的指标，由休克引起急性肾功能衰竭的机体尿液中极度增高，最高可达正常情况下的1200倍。急性肾小球肾炎、肾病综合症，毒物或药物引起的肾毒性反应均可使NAG增加。肾移植后，NAG的测定可用来判断有无排斥反应。

二、测定原理：

底物在 NAG 作用下水解，释放出游离的对硝基酚。加入碱性溶液停止反应，并使对硝基酚显色。在 400nm 处测吸光度，可计算酶活力单位。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
	试剂二配制：用时每瓶粉剂加入试剂一 3mL ，混匀充分溶解。		
试剂三	液体 15mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品 (1mg/mL)	液体 1mL×1 支	液体 1mL×2 支	2-8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，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 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体：直接测定。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零；
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 将1mg/mL标准品用蒸馏水依次稀释至0、10、20、40、60、80、100μg/mL，备用；
4. 操作表：

	测定管	对照管	空白管	标准管
样品（μL）	10	10	-	-
蒸馏水	-	-	10	
标准品（μL）	-	-	-	10
试剂一（μL）	100	100	100	100
试剂二（μL）	20	-	20	20
混匀，37℃孵育 15min				
试剂三（μL）	100	100	100	100
试剂二（μL）	-	20	-	-
混匀，静置 3min，于波长 405nm 酶标仪测定各管吸光度。ΔA=A 测定管 - A 对照管				

五、β-N-乙酰葡萄糖苷酶活性计算：

1、标准曲线绘制：以吸光度值为横坐标，标准品浓度为纵坐标，绘制标准曲线 $y=kx+b$ ， x 为吸光度值， y 为标准品浓度（μg/mL）。根据标准曲线，将 ΔA 带入公式计算出样本浓度（ y ，μg/mL）；

2、血清样本 β-N-乙酰葡萄糖苷酶计算

单位定义：每毫升血清每分钟催化产生 1μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式：β-N-乙酰葡萄糖苷酶（U/mL）= $y \div T$

3、组织、细胞样本 ACP 计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式：β-N-乙酰葡萄糖苷酶（U/mg prot）= $y \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

(2) 按样本鲜重计算

单位定义：每克组织催化产生 1μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式：β-N-乙酰葡萄糖苷酶（U/g）= $y \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1μg 对硝基酚的量为一个活力单位。

计算公式： β -N-乙酰葡萄糖苷酶 (U/10⁴ cell) = $y \times V_{\text{样}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL;

T: 反应时间, 15min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

500: 细胞/细菌数, 500 万;

六、 注意事项:

- 1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测;
- 2、试剂二需要密封避光保存。