

N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (N-acetyl-β-D-glucosidase, NAG) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

NAG 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，以前列腺和肾近曲小管细胞内含量最高。NAG 活性变化与机体某些病理状态密切相关。

测定原理：

NAG 分解β-N-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，通过测定吸光值升高速率来计算 NAG 活性。

组成：

产品名称	GMS044-50T/24S	Storage
提取液：液体	50ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二：液体	15ml	4°C
试剂三：液体	50ml	4°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，-20°C 保存；临用前每瓶加入 5ml 蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20°C 保存。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液提取：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (ml) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 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)；15000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量 (g)：提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1ml 提取液)，进行冰浴匀浆。15000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：



1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。

2、样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	200	
蒸馏水		200
试剂二	250	250
样本	50	50
迅速混匀，放入 37°C 准确水浴 30min		
试剂三	1000	1000

充分混匀，400nm 处测定吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

NAG 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00543x + 0.0083$ ；x 为标准品浓度 (nmol/ml)，y 为吸光值。

2、血清（浆）NAG 活力的计算

单位的定义：每 ml 血清（浆）每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$NAG \text{ 活力}(\text{nmol} / \text{min} / \text{ml}) = [(\Delta A - 0.0083) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 61.39 \times (\Delta A - 0.0083)$

3、细胞、细菌和组织中 NAG 活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$NAG \text{ 活性}(\text{nmol} / \text{min} / \text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.0083) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$
 $= 61.39 \times (\Delta A - 0.0083) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$NAG \text{ 活性}(\text{nmol} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0083) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 61.39 \times (\Delta A - 0.0083) \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1nmol 对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$NAG \text{ 活性}(\text{nmol} / \text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0083) \div 0.00543 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 0.123 \times (\Delta A - 0.0083)$

V 反总：反应体系总体积，0.5ml；V 样：加入反应体系中样本体积，0.05ml；V 样总：加入提取液体积，1ml；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/ml；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万；T：反应时间，30min。

