

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

### 微量法 100 管/48 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	GMS045-100T/48S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：粉剂	1 瓶	-20°C
试剂二：液体	4ml	4°C
试剂三：液体	13ml	4°C
说明书	一份	

试剂一：粉剂×1 瓶，-20°C 保存；临用前加入 2.5ml 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：

酶标仪/可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板/微量石英比色皿、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。
- 3、血清（浆）样品：直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



### 测定步骤:

- 1、酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 400nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定（在 EP 管或 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μl)	测定管	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10

迅速混匀，放入 37°C 保温 30min

试剂三	130	130
-----	-----	-----

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  $y = 0.00585x + 0.0083$ ；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 活力(nmol/min/ml) =  $[(\Delta A - 0.0083) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 39.89 \times (\Delta A - 0.0083)$

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 活性(nmol/min/mg prot) =  $[(\Delta A - 0.0083) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$   
 $= 39.89 \times (\Delta A - 0.0083) \div C_{\text{pr}}$

(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 活性(nmol/min/g 鲜重) =  $[(\Delta A - 0.0083) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
 $= 39.89 \times (\Delta A - 0.0083) \div W$

(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 活性(nmol/min /  $10^4$  cell) =  $[(\Delta A - 0.0083) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
 $= 0.08 \times (\Delta A - 0.0083)$

V 反总：反应体系总体积，0.07ml；V 样：加入反应体系中样本体积，0.01ml；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。

#### b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为  $y = 0.0039x + 0.0083$ ；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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



NAG 活力(nmol /min/ml)=  $[(\Delta A-0.0083) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 59.83 \times (\Delta A-0.0083)$

### 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 活性(nmol/min/mg prot)=  $[(\Delta A-0.0083) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$   
 $= 59.83 \times (\Delta A-0.0083) \div C_{\text{pr}}$

(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 活性(nmol/min/g 鲜重)=  $[(\Delta A-0.0083) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
 $= 59.83 \times (\Delta A-0.0083) \div W$

(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 活性(nmol/min / $10^4$ cell)=  $[(\Delta A-0.0083) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$   
 $= 0.12 \times (\Delta A-0.0083)$

V 反总: 反应体系总体积, 0.07ml; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.01ml; 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。

