



N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶活性检测试剂盒

NAG Assay Kit

微量法

产品编号: AK397M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES397	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK397-A	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 2.5mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 剩余试剂-20℃保存;
AK397-B	4mL×1 瓶	4℃保存;
AK397-C	13mL×1 瓶	4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: N-乙酰葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosidase, NAG)是一种细胞内溶酶体酶,存在于肾、肝、脾及脑等脏器,以肾近曲小管含量最高。NAG 相对分子质量较大,不能由肾小球滤过,在肾脏受损时由细胞内释放至肾小管中,尿中 NAG 明显升高,尿 NAG 活性对于肾小管病变是一个很灵敏且特异性较强的指标之一,可作为肾小管受损的早期诊断指标,甚至比尿白蛋白有更早的预测价值。

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。

自备用品:

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): ES397 体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES397),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℃离心 10min,取上清,置冰上待测。
2. 组织: 按照组织质量(g): ES397 体积(mL)为 1: 5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL ES397),进行冰浴匀浆。15000g 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。
3. 血清(浆)样品: 直接检测。

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	测定管(μL)	对照管(μL)
AK397-A	25	
蒸馏水		25
AK397-B	35	35
样本	10	10
迅速混匀,放入 37℃保温 30min		
AK397-C	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

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。

1. 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。

$$\text{NAG 活力 (nmol/min/mL)} = [(\Delta A - 0.0083) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}] \div V_{\text{样}} \div T = 39.89 \times (\Delta A - 0.0083)$$

2. 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。

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

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.07mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 ES397 体积, 1mL; C_{pr} : 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

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。

1. 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。

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

2. 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。

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

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.07mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入 ES397 体积, 1mL; C_{pr} : 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))