

β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)测定试剂盒说明书(精简版)

(货号:A031-1-1 比色法 50 管/24 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,
否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β-N-Acetylglucosaminidase, NAG)广泛存在于各种组织器官、体液、红细胞、白细胞及血小板中,是溶酶体中的一种酸性水解酶。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。

二、试剂组成及配制: (试剂 2-8℃保存,有效期 6 个月)

试剂一: 溶液 40mL×1 瓶。

试剂二: 底物, 粉剂×1 支。

试剂三: 终止剂 60mL×2 瓶。

试剂四: 液体 6mL×1 瓶。(天冷会有结晶析出,测试前置于 37℃水浴直至透亮)

试剂五: 3mmol/L 对硝基酚标准贮备液 2mL×1 瓶。用时取部分 3mmol/L 对硝基酚标准贮备液与蒸馏水 1:4 混合,配成 **600μmol/L 对硝基酚标准应用液**,现用现配。

底物缓冲液的配制: 底物溶解度小,配制底物溶液时,应先用适量试剂一将试剂二粉剂 1 支调成糊状,再边搅拌边逐渐加试剂一到 30mL,混匀至完全溶解(不可加热)。配好后的底物缓冲液为过饱和溶液,如有结晶,可静置或离心后取上清进行检测。用不完的底物缓冲液 4℃可保存两个月以上。

三、所需仪器耗材及试剂:

含 400nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿(或酶标仪及 96 孔板)、37℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水(0.9%)或 PBS(0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(组织及细胞样本用,本公司有售)。

四、液体样本中 NAG 测定:

1、样本前处理: 直接取样测定。

2、操作步骤:

	空白管	标准管	测定管	对照管
蒸馏水 (mL)	0.1			
0.6mmol/L 标准液 (mL)		0.1		
样品 (mL)			0.1	0.1
试剂一 (mL)	0.5	0.5		
底物缓冲液 (mL)			0.5	
混匀, 37℃准确反应 15 分钟。				
试剂三 (mL)	2	2	2	2
底物缓冲液 (mL)				0.5
试剂四 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05
混匀, 在 400nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零测各管吸光度值 A				

3、计算:

①、定义: 每升样品每分钟在 37℃与底物作用,水解产生 1μmol 对硝基酚为 1 个酶活力单位(U)。

②、计算公式:

$$\text{NAG 活力 (U/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{标准}}}{V_{\text{样}}} \div T$$

C_{标准}: 标准液浓度,600μmol/L;

V_{标准}: 标准品取样量, 0.1×10⁻³L;

V_样: 样本取样量, 0.1×10⁻³L;

T: 反应时间,15 分钟。

五、组织样本中 NAG 的测定

1、样本前处理:

准确称取样本的重量,按照重量(g):体积(mL)=1 : 9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制成 10%匀浆,2500 转/分,离心 10 分钟,取上清再用生理盐水稀释成 1%的匀浆液待测。(该匀浆浓度仅为参考用,客户测定时可以根据这一浓度自行摸索样本的实际所需浓度)

2、操作步骤:

	空白管	标准管	测定管	对照管
蒸馏水 (mL)	0.02			
3mmol/L 标准液 (mL)		0.02		
样品 (mL)			0.02	0.02
试剂一 (mL)	0.5	0.5		
底物缓冲液 (mL)			0.5	
混匀, 37℃准确反应 15 分钟。				
试剂三 (mL)	2	2	2	2
底物缓冲液 (mL)				0.5
试剂四 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05
混匀, 在 400nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零测各管吸光度值 A				

3、计算:

①、定义: 每克组织蛋白与底物在 37℃作用 1 分钟,水解产生 1μmol 对硝基酚为 1 个酶活力单位(U)。

②、计算公式:

$$\text{组织 NAG 活力 (U/gprot)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times \frac{V_{\text{标准}}}{V_{\text{样}}} \div T \div \text{Cpr}$$

C_{标准}: 标准液浓度, 3mmol/L (3000μmol/L);

T: 反应时间,15 分钟;

V_{标准}: 标准品取样量, 0.1×10⁻³L;

V_样: 样本取样量, 0.1×10⁻³L;

Cpr: 组织匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白)。

六、注意点:

- 1、用分光光度计测定时吸光度至 0.60 或酶活力至 60 单位呈线性,超出此范围应将标本用生理盐水稀释后重测,结果乘以稀释倍数。
- 2、尿酶浓度随尿流率而变动,因此尿酶测定要求留取 24 小时尿;但因留 24 小时尿不方便,也不准确,故用“酶单位/肌酐”比值计算酶排出率,效果较好。