

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。

自备用品:

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。

试剂组成和配制:

提取液:液体 50mL×1 瓶,4℃ 保存。

试剂一:粉剂×1 瓶,-20℃ 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℃ 保存。

试剂二:液体 15mL×1 瓶,4℃ 保存。

试剂三:液体 50mL×1 瓶,4℃ 保存。

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℃ 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℃ 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℃ 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 活力(nmol /min/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 活性(nmol/min/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 活性(nmol/min/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 活性(nmol/min / 10^4 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。