

组织及血液N-乙酰-β-D -葡萄糖苷酶（NAG）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC5-C24	组织及血液N-乙酰-β-D -葡萄糖苷酶（NAG）试剂盒	24T	常量法

产品说明：

SDH（EC 1.3.5.1）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。SDH是线粒体的一种标志酶，位于线粒体 内膜上的一种膜结合酶，是连接呼吸电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一。此外，为多种原核细胞产能的呼吸链提 供电子。

SDH催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸，脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸（PMS）传递还原2,6-二氯酚靛酚（DCPIP），并且在600nm处具有特征吸收峰，通过600nm吸光度的变化，测定2,6-DCPIP的还原速度，代表SDH酶活性。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体30 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂三	液体60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃ 保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前取一瓶加入2.5 mL 蒸馏水溶解备用；可-20℃分装保存4 周，避免反复冻融；
- 2、标准品：5 μmol/mL 对硝基苯酚溶液。

操作步骤：

一、样本处理

- 1、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0.1g 组织，加入 1mL 提取液），冰浴匀浆。15000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：先收集细胞或细菌样本到离心管内，离心弃上清后，按照细胞数量 10⁴ 个:提取液体积(mL) 500~1000:1 的比例，建议500 万细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细胞（冰浴，功率200w，超声3s，间隔7s， 总时间3min），然后 15000g，4℃, 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）等液体：直接测定。

二、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、标准溶液的稀释：取125 μ L 5 μ mol/mL对硝基苯酚溶液，加入875 μ L蒸馏水，充分混匀，配制成0.625 μ mol/mL标准液使用，现用现配。（实验中每管需要50 μ L，为减小实验误差，故配制大体积。）
- 3、操作表（在1.5mL离心管中依次加入下列试剂）：

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
试剂一	300	300	300	300
试剂二	150	-	-	-
蒸馏水	-	150	150	200
标准液	-	-	50	-
样本	50	50	-	-
置于37℃水浴锅或恒温培养箱反应30min			-	-
试剂三	1000	1000	1000	1000

混匀后室温放置2min，测定 400nm 的吸光度，分别记为A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管。计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管。每个测定管需设一个对照管。标准管和空白管只需测 1-2 次。

三、NAG活性计算

1、按蛋白浓度计算

活力单位定义：每mg蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAG (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本质量计算

活力单位定义：每g样本在反应体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAG (U/g 质量)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

3、按细胞数量计算

活力单位定义：每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAG (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

4、按液体体积计算

活力单位定义：每毫升液体在反应体系中每分钟催化生成1nmol对硝基苯酚为一个酶活力单位。

$$\text{NAG (U/mL)} = \Delta A_{\text{测定}} \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标}}) \times 1000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 20.83 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C标：标准溶液浓度：0.625 μ mol/mL；V样：加入的样本体积，0.05mL；V样总：提取液体积，1mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，30min；细胞数量：以万计；W：样本质量，g；1000：换算系数，1 μ mol=1000nmol。

注意事项：

吸光度若大于1.2时，建议将样本用提取液稀释后进行测定。