

## N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)

产品编号	产品名称	包装
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

### 产品简介:

- 碧云天研发的N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法) (N-Acetylglucosaminidase Activity Assay Kit, Colorimetric), 简称NAG检测试剂盒(NAG Assay Kit), 是一种用比色法, 快速、高灵敏地对血清、血浆和尿液等生物体液、组织和细胞裂解液以及细胞培养上清等样品中N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性进行检测的试剂盒。
- N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(N-Acetylglucosaminidase, NAG)是一种位于细胞溶酶体的酸性糖苷酶, 可水解 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷和 $\beta$ -N-乙酰氨基半乳糖苷, 广泛存在于各种组织器官、体液和血细胞中, 在肾小管和泌尿道上皮细胞内含量特别丰富[1]。因为其分子量大, 正常情况下血清中的NAG不能通过肾小球滤过, 在尿液中的含量是很低的。当肾脏病变时, NAG在尿液中的排出量会增加, 因此尿NAG测定是检测肾损伤, 特别是肾小管缺血、坏死的敏感指标[2]。尿液中NAG升高常见于肾小球肾炎、肾小管-间质病变、先天性肾小管病变、肾移植排斥期及狼疮肾等。因休克引起的急性肾衰, 尿液中NAG酶可高达正常值的1200倍。在肾移植术后发生的排异反应中, 该酶在一般肾功能检查确诊为排异反应前3周即可出现。N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性检测对于临床相关疾病的诊断、预防和治疗等具有重要的意义[2]。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。在酸性条件下, N-乙酰氨基葡萄糖苷酶将底物对硝基苯酚-N-乙酰氨基葡萄糖苷(p-Nitrophenyl-N-acet-glucosaminide)水解生成游离的对硝基苯酚(p-Nitrophenol), 在碱性条件下, 对硝基苯酚呈黄色, 在400nm左右有最大吸收峰。反应体系中生成的黄色产物的量与样品中N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性成正比。



图1. 碧云天N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法) (S0538)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。本试剂盒在样品体积为20 $\mu$ l时可以检测浓度低至13 $\mu$ U的酶, 在0.67-66.7U/L活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的作用产物对硝基苯酚的标准溶液, 可以通过设置标准曲线(图2), 计算出样品中的N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活力。

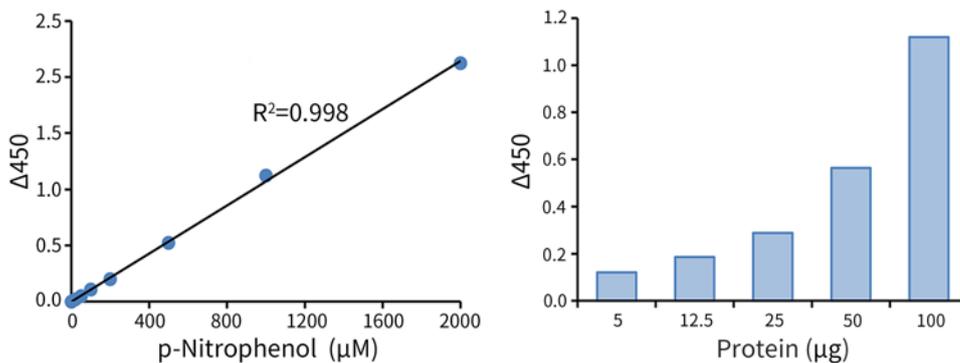


图2. 碧云天N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法) (S0538)检测对硝基苯酚的标准曲线及小鼠肝脏样品的检测效果。左图为本试剂盒对标准品对硝基苯酚的检测效果, 在20-2000 $\mu$ M浓度范围内有良好的线性关系; 右图为对不同蛋白量的小鼠肝脏裂解液样品的检测效果图, 反应时间为30分钟。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品, 也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测, 通用性强; 而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- 本试剂盒检测速度快, 适用范围广。本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液, 细胞培养上清及组织或细胞裂解液样品等的检测, 全程约0.5-1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样本的检测, 也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作, 用于96孔板检测时, 本试剂盒小包装可以进行100次检测。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0538S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	25ml
S0538S-2	NAG检测缓冲液	25ml
S0538S-3	底物	210μl
S0538S-4	反应终止液	12ml
S0538S-5	对硝基苯酚标准溶液(50mM)	200μl
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中底物、对硝基苯酚标准溶液须避光保存。所有试剂避免反复冻融。

### 注意事项：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、NAG检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)和反应终止液需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它试剂在使用时应在冰上进行。
- 血清等样品如在4°C保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 样品的准备：

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25°C下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

#### 2. 试剂盒的准备：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、检测缓冲液和反应终止液，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 底物工作液(Working Solution)的配制：按照每个检测反应80μl的体积配制适量的底物工作液。均匀混合78μl检测缓冲液(NAG Assay Buffer)、2μl底物(Substrate)，即可配制成80μl底物工作液(Working Solution)。根据待检测样品(包括标准品和对照)的数量，配制适量的底物工作液。具体配制方法参考下表。

Samples	1	10	20	50
NAG Assay Buffer (μl)	78	780	1460	3900
Substrate (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

#### 3. 对硝基苯酚标准曲线的准备：

取4μl对硝基苯酚标准溶液(50mM)，加入96μl检测缓冲液，混匀，配制成100μl浓度为2mM的对硝基苯酚标准溶液。再分别取2mM的对硝基苯酚标准溶液3.125、6.25、12.5、25、50μl，并用检测缓冲液补足到50μl。此时标准品的浓度分别为0.125、0.25、0.5、1、2mM。检测时96孔板中每孔加入20μl的标准品，并设置20微升检测缓冲液孔作为浓度为0的孔。

#### 4. 样品测定：

- 参考下表使用96孔板设置标准品孔、样品孔和样品对照孔。并按下表依次加入标准品(Standard)、待测样品(Sample)、终止液(Stop Solution)和底物工作液(Substrate Working Solution)，混匀。

注：不同样品中NAG的活性水平差别可能会比较大，为确保数值在标准曲线范围内，可以进行预实验将样品同时设定不同的稀释倍数，以确定样品的大致浓度。如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或增加样品的用量。样品稀释倍数记为n。

	标准品(Standard)	样品(Sample)	样品对照(Blank)
Standard (μl)	20	-	-
Sample (μl)	-	20	20

Stop Solution (μl)	-	-	100
Substrate Working Solution (μl)	80	80	80

- b. 37°C孵育30分钟，反应时间记为T。  
注：为取得最佳的检测效果，孵育时间可以根据样品中NAG活性进行调整，但是必须确保读数在标准曲线范围内。对于NAG活性较高的样品，可以缩短孵育时间为10到15分钟；对于NAG活性较低的样品，可以延长孵育时间至45到60分钟。
- c. 除样品对照的各孔加入反应终止液100μl，混匀。
- d. 37°C孵育10分钟，测定A400， $\Delta A = A_{\text{sample}} - A_{\text{Blank}}$
- e. 建立对硝基苯酚标准曲线，将 $\Delta A$ 代入标准曲线，即可计算出在反应时间内样品中NAG催化产生的对硝基苯酚的浓度(记录为B)。对硝基苯酚标准曲线可以参考图2，在20-2000μM浓度范围内有良好的线性关系。样品中NAG活性计算公式如下：  
N-Acetylglucosaminidase Activity (U/L) =  $B \times n / T$   
注：B为步骤4e根据标准曲线确定的对硝基苯酚浓度(μM)；  
n为步骤4a样品稀释倍数；  
T为步骤4b的反应时间(min)。  
NAG活力单位的定义：1个酶活力单位(unit, U)在37°C条件下，在1分钟内可以将1μmol对硝基苯酚-N-乙酰氨基葡萄糖苷转化成对硝基苯酚和N-乙酰氨基葡萄糖苷。

### 参考文献：

1. von Figura K. Eur J Biochem. 1977. 80(2):535-542.
2. Mohamed Ali OS, Elshaer SS, Anwar HM, Zohni MSE. J Biochem Mol Toxicol. 2017. 31(11).

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018S/M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S/M	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S/M	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215S/M	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219S/M	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223S/M	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0243S/M	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次

S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red $\alpha$ -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次

Version 2024.07.12