（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K064-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(395-410 nm)

Elabscience®β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)

比色法测试盒

β-N-Acetylglucosaminidase (NAG)

Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血浆、血清、动物组织和细胞样本中的β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)的活力。

检测原理

β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)催化底物反应生成对硝基苯酚,对硝基苯酚在波长400 nm处有最大吸收,通过测定400 nm处的OD值大小反映出NAG酶活的大小。

本试剂盒检测组织样本和细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用BCA法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物溶液 (Substrate Solution)	5 mL×1 瓶	-20ºC 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	14 mL×1 瓶	-20ºC 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	-20ºC 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(390-415 nm，最佳检测波长 400 nm)、37ºC 恒温箱

试剂：双蒸水、生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 20 mmol/L标准品溶液的配制：

向试剂四中加入1 mL双蒸水，40ºC避光加热3 min至溶解，配制成20 mmol/L标准品，未使用完的试剂分装后可在-20°C保存3个月。

③ 0.5 mmol/L标准品溶液的配制：

将20 mmol/L标准品：双蒸水按体积比=1:39配制成0.5 mmol/L标准品，现配现用，按需配制，避光待用。

④ 测定工作液的配制：

将试剂一:试剂二按体积比=7:2配制，现配现用，一天内使用完。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.1**	**0.15**	**0.2**	**0.3**	**0.35**	**0.4**	**0.5**
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水（0.9% NaCl）体积(mL)=1:9的比例匀浆，4ºC，10000 × g离心10 min。取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取1 × 10^6个细胞样本加入200 μL生理盐水（0.9% NaCl）匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

血清(浆)样本：直接测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.76-49.51 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10 %小鼠肝组织	3-5	人血清	不稀释
10%小鼠肾组织	3-5	胎牛血清	不稀释
10 %小鼠心组织	3-5	6×10^6 CHO 细胞	不稀释
10 %小鼠肺组织	3-5	0.6×10^6 293T/17 细胞	不稀释
大鼠血浆	不稀释		

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。测定孔、对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中标准孔和测定孔中加入 160 μL 测定工作液，对照孔中加入 160 μL 试剂一。

③ 振板 5 s，37°C 孵育 10 min。

④ 向步骤③中标准孔、测定孔、对照孔加入 100 μL 试剂三。

⑤ 振板 5 s，酶标仪于 400 nm 波长下检测，测定各孔吸光度。

操作表

	标准孔	**测定孔**	**对照孔**
不同浓度标准品溶液(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
试剂一(μL)	--	--	160
测定工作液(μL)	160	160	--
振板 5 s，37°C 孵育 10 min			
试剂三(μL)	100	100	100
振板 5 s，酶标仪于 400 nm 波长下检测，测定各孔吸光度。			

本试剂盒检测组织样本和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

① 血清（浆）中β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（NAG）活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{NAG 活力 (U/L)} = (\Delta A_{400} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

② 组织样本和细胞样本中β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（NAG）活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{NAG 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{400} - b) \div a \div T \times f \div C_{pr} \times 1000$$

注解：

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{400}：样本的绝对 OD 值（$\Delta A_{400} = A_{测定} - A_{对照}$）

T：反应时间，10 min

f：样本的稀释倍数

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

1000：1 mmol/L = 1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

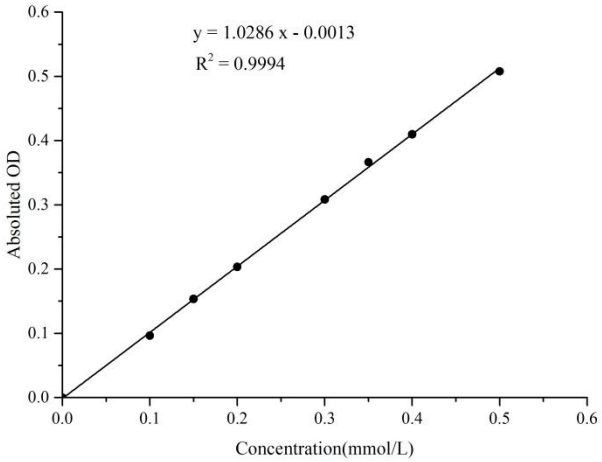
检测范围	0.76-49.51 U/L	**批间差**	4.6-6.8 %
灵敏度	0.76 U/L	**批内差**	3.2-5.0 %
回收率	92-98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.1**	**0.15**	**0.2**	**0.3**	**0.35**	**0.4**	**0.5**
OD 值	0.064	0.161	0.218	0.267	0.372	0.435	0.471	0.573
	0.065	0.161	0.218	0.269	0.374	0.427	0.478	0.572
平均 OD 值	0.065	0.161	0.218	0.268	0.373	0.431	0.475	0.573
绝对 OD 值	0.000	0.097	0.154	0.204	0.309	0.367	0.410	0.508

② 绘制标曲(如下图)：



附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织 (数据仅供参考)：

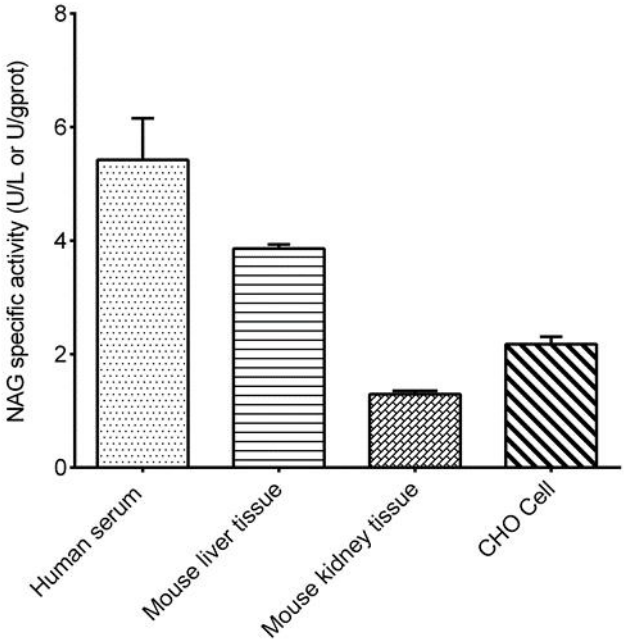
取稀释4倍的10%小鼠肝组织上清液20 μL，按说明书操作，结果如下：

标准曲线：y = 1.0286x - 0.0013，对照孔OD值$A_{对照}$为0.089，测定孔OD值$A_{测定}$为0.178，$\Delta A_{400} = A_{测定} - A_{对照} = 0.178 - 0.089 = 0.089$，测定出10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为9.00 gprot/L，计算结果为：

$$\text{NAG活力(U/gprot)} = (0.089 + 0.0013) \div 1.0286 \div 10 \times 4 \div 9.00 \times 1000$$

$$= 3.90 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作，测定人血清(加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆的蛋白含量为9.00 gprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠肾组织 (10%组织匀浆的蛋白含量为9.84 gprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、CHO细胞(蛋白含量0.14 gprot/L，加样量20 μL)中的NAG活力(如下图)：



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。