

N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)

产品货号: BA2993

产品规格: 100T

产品简介:

尚宝研发的N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法), 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 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷和 β -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。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。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。

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-acetylglucosaminide)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. 尚宝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 μ l时可以检测浓度低至13 μ 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。

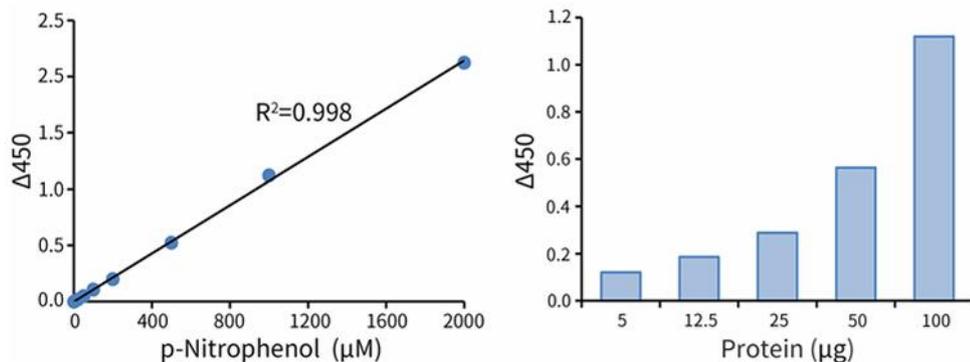


图2. 尚宝N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)检测对硝基苯酚的标准曲线及小鼠肝脏样品的检测效果。左图为本试剂盒对标准品对硝基苯酚的检测效果, 在20-2000 μ M浓度范围内有良好的线性关系; 右图为对不同蛋白量的小鼠肝脏裂解液样品的检测效果图, 反应时间为30分钟。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

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Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品, 也可以用于尚宝生产的其它代谢类试剂盒中同样使用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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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。

产品组成：

产品名称	规格	保存条件
Buffer A for Metabolic Assay	25ml	-20°C
NAG检测缓冲液	25ml	-20°C
底物	210μl	-20°C，避光
反应终止液	12ml	-20°C
对硝基苯酚标准溶液(50mM)	200μl	-20°C，避光

使用说明：

1. 样品的准备：

a. 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。

b. 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS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 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Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用高通量组织研磨仪（1.5/2ml×48）、手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约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。

c. 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：

a. 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。

b. 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	1500	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微升检测缓冲孔作为浓度为0的孔。

4. 样品测定：

a. 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)、



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 ΔA 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： $N\text{-Acetylglucosaminidase Activity (U/L)} = B \times n / T$

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。

注意事项：

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com