天净沙系列

CAT#:7-EC3.2.1.52

低温运输，-20℃保存

天净沙

# β-N-乙酰己糖胺酶活性测定试剂盒（比色法）

# β-N-Acetylhexosaminidase Assay Kit

## 使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

本产品用于测定β-N-乙酰己糖胺酶（β-N-acetylhexosaminidase，NAG，EC 3.2.1.52，CAS 9012-33-3）活性。其原理是 NAG 催化底物 CNP-NAG 反应生成 CNP，CNP 在 405 nm 处有最大吸光度，故通过监测吸光度随时间的变化（ΔA405/min）即可计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 使用便捷，用户只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.035 U，线性范围在 0.035 U-6.7 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 25℃ pH 5.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个 NAG 底物分子的转化将产生 1 个 CNP 分子，故 1 个酶活性单位相当于在 25℃ pH 5.0 的条件下每分钟催化 1 μmol CNP 产生所需的酶量。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
5. 本产品只可用于科研。

## 规格及成分

本产品采用塑料袋包装

| 成份 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| NAG 活性测定反应液 | 7-EC3.2.1.52r | 120 mL | 125 mL 本色瓶 |
| NAG 底物干粉 | 7-EC3.2.1.52s | 100 T | 1.5 mL 棕色管 |
| 使用手册 | 7-EC3.2.1.52sc | 1 份 | 无 |

## 运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

## 自备试剂

待测样品，样本溶解液，超纯水，比色皿，分光光度计。

## 使用方法

**一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液**

1. 配制底物混合液：在 1 个 100 mL 干净塑料瓶中，加入 98 mL NAG 酶活性测定反应液活性测定反应液，然后加入所有 NAG 底物干粉，颠倒混匀即至彻底溶解后得底物混合液。此溶液足够 100 次测定。可根据每次反应数分成小份，用锡箔纸包好（必须避光），放-20℃或更低温度保存，每次取用 1 份。

**二、制备待测样本**

2. 用自备试剂制备待测样品。注意：由于本试剂盒测定的是 CNP，故样本中也不得有 CNP 的成份。
3. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。
4. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

**三、1 mL 体系 1 cm 光径比色皿测定**

5. 如果有 N 个待测样本，每个只做一次重复，则标注 N+1 个试管，多出的一个用做阴性对照（空白对照）。

6. 在 25℃恒温条件下按下表进行加样，总体系为 1 mL：

| 成分 | 阴性对照管 | N 个待测样品管 |
|---|---|---|
| 底物混合液 | 980 μL | 各 980 μL |
| 第 3 步所备的样本溶解液 | 20 μL | 不加 |
| 待测样本 | 不加 | 各 20 μL |

7. 加入最后成分后立即混匀并转移到比色皿中在在 405 nm 波长下测光吸收 A。每隔半分钟测一次，共测 3 分钟，每个管的样品将得到 6 个测定值。

**四、数据处理**

8. NAG 酶活性测定反应液活性单位的定义是在 25℃ pH 5.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量，故按下面步骤计算出样本的△A/min，再将其换算成产物的μmol 数。

9. 计算△A/min 测定值：以时间为横轴，以样本不同时间点的 A 值为纵轴，选择 A 值呈线状的区域计算△A/min，此为测定值。空白样本（阴性对照管）也需要计算。

10. 计算△A/min 真实值：样本△A/min 测定值-空白样本△A/min 测定值=样本△A/min 真实值。

11. 将△A 换算成所测产物浓度变化：根据朗伯-比尔定律△A=εlc=消光系数*光径*浓度，则浓度=△A/（消光系数*光径）。代入 CNP 在 405 nm 的消光系数 3242 L/cm*mol 和比色皿光径 1 cm，则浓度=△A/[（6220 L/cm*mol）*1 cm] =（△A/3242）mol/L=（△A/3.242）μmol/mL。注：绝大部分比色皿是 1 cm，如果所用比色皿不是则改成实际光径。

12. 将产物浓度换算μmol 数和酶单位数：本检测反应体积为 1 mL，故底物μmol 数=浓度*1 mL=[（△A/3.242）μmol/mL]*1 mL=（△A*1/3.242）μmol。根据酶单位定义，则 NAG 酶活性测定反应液的单位数=产物μmol 数=（△A/3.242）U。

13. 计算样本中的酶浓度：由于加入到 1 mL 反应体系中的样本体积为 0.02 mL，故在样本中的浓度为（△A/3.242）U/0.02 mL=（△A*50/3.242）U/mL。

14. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本

| | |
|---|---|
| | 酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。 |
| **关联产品** | 谷氨酰胺酶活性测定试剂盒 |

20250530hb-wjw