

5'-核苷酸酶(5'-NT)检测试剂盒(钼蓝微板法)

产品简介:

5'-核苷酸酶(5'-NT 或 NTP)广泛分布于肝脏、胆道及其他各种组织中,该酶活性变化常与 ALP 活性相平行。但在骨骼系统的疾病中,如肿瘤骨转移、畸形性骨炎、甲亢、佝偻病等,ALP 活力增高,但是 5'-NT 活力正常,所以对于 ALP 活力提高的情况,测定 5'-NT 活力有助于判断 ALP 活力增高原因是肝胆系统疾病还是骨骼系统疾病。

Biorigin 5'-核苷酸酶(5'-NT)检测试剂盒(钼蓝微板法)的检测原理为 5'-核苷酸酶能催化 5'-磷酸腺苷(AMP)水解,生成腺苷和磷酸,后者与钼酸铵反应生成钼蓝,可用比色法测定无机磷的含量,计算 5'-NT 活性,利用镍离子能选择性的抑制 5'-NT 的特性,在测定管不加入抑制剂镍离子,测出的活性为 ALP 和 5'-NT 总活性,在对照管加入镍离子,可以测出 ALP 的活性,测定管的酶活性减去对照管的酶活性即获得 5'-NT 活性,通过酶标仪检测 680nm 处吸光度。5'-核苷酸酶的检测对于研究自由基代谢平衡,抗衰老和肿瘤发病机制具有一定的价值。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

名称	编号	BN27245	Storage
		100T	
试剂(A): NT Assay Buffer I		15ml	4°C
试剂(B): NT Assay Buffer II		2ml	RT
试剂(C): NT Assay Buffer III		1ml	RT
试剂(D): 5'-AMP Buffer		2ml	4°C
试剂(E): AMP 酸性缓冲液		50ml	RT 避光
试剂(F): 磷标准(6mmol/L)		1ml	4°C
试剂(G): 定磷酸性液		18ml	RT
试剂(H): 定磷还原液		3ml	4°C 避光
试剂(I): 钼酸铵粉剂		1g	RT
使用说明书			1 份

自备材料:

- 1、蒸馏水、生理盐水
- 2、电子天平、离心管或小试管、离心机
- 3、水浴锅或恒温箱、96 孔板、酶标仪

本产品仅用于科研

操作步骤(仅供参考):

1、准备样品:

- ①血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备, 可以直接用于该试剂盒的测定, 尿液通常也可以直接用于测定, -20°C 冻存, 用于 5'-NT 的检测。
- ②细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织进行裂解, 可以采用 RAPI 裂解液, 如果有必要需进行适当匀浆, 低速离心取上清, -20°C 冻存, 用于 5'-NT 的检测。
- ③高活性样品: 如果样品中含有较高活性的 5'-NT, 可以使用 AMP 酸性缓冲液稀释。
- ④(选做)样品准备完毕后可以用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 以便于后续计算单位蛋白重量组织或细胞内的 5'-NT 含量。

2、配制对照 NT Assay 工作液: 取适量的 NT Assay Buffer I、II、III, 按 I: II: III=13: 1: 2 的比例混合, 即为对照 NT Assay 工作液, 4°C 保存备用。

3、配制测定 NT Assay 工作液: 取适量的 NT Assay Buffer I、II, 按 I: II=15: 1 的比例混合, 即为测定 NT Assay 工作液, 4°C 保存备用。

4、配制磷标准工作液: 取适量的磷标准(6mmol/L), 按磷标准(6mmol/L): AMP 酸性缓冲液=1: 99 的比例混合, 即为磷标准工作液(0.06mmol/L), 4°C 保存 1 个月。

5、配制钼酸铵溶液: 称取一定量钼酸铵粉剂, 加入蒸馏水, 配制成 5%的钼酸铵溶液。

6、配制定磷工作液: 按定磷酸性液: 定磷还原液: 钼酸铵溶液=6: 1: 1 混匀, 即为定磷工作液, 4°C 保存。

7、NT 酶促反应: 按照下表设置对照管、测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。

加入物(ml)	对照管	测定管
待测样品	0.01	0.01
对照 NT Assay 工作液	0.08	—
测定 NT Assay 工作液	—	0.08
混匀, 置于 37°C 水浴保温 5min。		
5'-AMP Buffer	0.01	0.01
混匀, 置于 37°C 水浴保温 30min。		
AMP 酸性缓冲液	0.1	0.1

上表中各管充分混匀, 3000g 离心 10min, 取 0.1ml 上清液按下表进行显色反应。

8、NT 显色反应: 按照下表设置空白管、标准管、对照管、测定管溶液应按照顺序依次加入 96 孔板, 并注意避免产生气泡。如果样品中的酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定。

加入物(ml)	空白管	标准管	对照管	测定管
蒸馏水	0.05	0.05	—	—
标准工作液	—	0.05	—	—
对照管上清液	—	—	0.1	—
测定管上清液	—	—	—	0.1
AMP 酸性缓冲液	0.05	—	—	—
定磷工作液	0.2	0.2	0.2	0.2

9、NT 测定：混匀，静置 5min，蒸馏水调零，酶标仪测定 680nm 处吸光度(分别记为 $A_{空白}$ 、 $A_{标准}$ 、 $A_{对照}$ 、 $A_{测定}$)。

计算：

5'-NT 活性单位的定义：在 37°C 条件下 1L 血清与底物作用，1min 催化产生 1 μ mol 磷酸(以磷计)为 1 个 5'-NT 酶活力单位，根据酶活性定义计算出样品中的 5'-NT 活性。

血清、血浆、尿液中 5'-NT 活力计算公式：

$$\begin{aligned} & \text{血清 5'-NT 活力(U/L)} \\ &= \left[\frac{(A_{测定} - A_{对照})}{(A_{标准} - A_{空白})} \right] \times 0.06 \times 1000 \times N / (30 \times 0.005) \\ &= (A_{测定} - A_{对照}) / (A_{标准} - A_{空白}) \times 400 \times N \end{aligned}$$

组织、细胞中 5'-NT 活力计算公式：

$$\begin{aligned} & \text{组织、细胞 5'-NT 活力(U/mg)} \\ &= \left[\frac{(A_{测定} - A_{对照})}{(A_{标准} - A_{空白})} \right] \times 0.06 \times N / (30 \times 0.005 \times 10^{-3} \times \text{待测样品蛋白浓度}) \\ &= (A_{测定} - A_{对照}) / (A_{标准} - A_{空白}) \times 400 \times N / \text{待测样品蛋白浓度} \end{aligned}$$

式中： $A_{测定}$ = 测定管的吸光度

$A_{对照}$ = 对照管的吸光度

$A_{标准}$ = 标准管的吸光度

$A_{空白}$ = 空白管的吸光度

0.06 = 磷标准工作液(0.06mmol/L)

30 = 酶促反应时间(min)

0.005 = 实际参加反应的样品体积(ml)

N = 待测样品检测前的稀释倍数

待测样品蛋白浓度 单位 g/L

注意事项：

- 1、本试剂盒亦可用分光光度计进行检测，但检测的样品数相应减少，如果有条件尽量采用分光光度计检测，使其结果更为准确。

- 2、待测样品中不能含有 5'-NT 抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 3、用血浆测定有可能引起浑浊。
- 4、溶血有轻度影响，脂血症不会引起酶活性改变，但可能影响吸光度。
- 5、与金属螯合的抗凝剂会干扰金属离子的激活作用，因此不宜采用金属螯合抗凝剂。
- 6、离心管或试管必须清洁，否则污染显色反应。
- 7、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 8、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效；低温运输，4℃保存。