

5'-核苷酸酶(5'-NT)检测试剂盒(钼蓝微板法)

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。

源叶生物 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。

组成:

名称	编号	R21939	Storage
试剂(A): NT Assay Buffer I		100T	
试剂(A): NT Assay Buffer I		15ml	RT
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	4°C 避光
试剂(F): 磷标准(6mmol/L)		1ml	4°C
试剂(G): 定磷酸性液		18ml	RT



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

试剂(H): 定磷还原液	3ml	4°C 避光
试剂(I): 钼酸铵溶液	3ml	4°C
使用说明书	1 份	

自备材料:

- 1、蒸馏水、生理盐水
- 2、离心管或 EP 管
- 3、离心机、水浴锅
- 4、96 孔板、酶标仪

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℃保存 1 个月。

5、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，即为定磷工作液工作液，4℃保存。

6、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℃ 水浴保温 5min。		
5'-AMP Buffer	0.01	0.01
混匀，置于 37℃ 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。

7、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



8、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 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$)。

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 μmol 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:

血清 5'-NT 活力(U/L)

$$= \{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})\} \times 0.06 \times 1000 \times N / (30 \times 0.005)$$

$$= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 400 \times N$$

组织、细胞中 5'-NT 活力计算公式:

组织、细胞 5'-NT 活力(U/mg)

$$= \{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})\} \times 0.06 \times N / (30 \times 0.005 \times 10^{-3} \times \text{待测样品蛋白浓度})$$

$$= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 400 \times N / \text{待测样品蛋白浓度}$$

式中: $A_{\text{测定}}$ = 测定管的吸光度

$A_{\text{对照}}$ = 对照管的吸光度

$A_{\text{标准}}$ = 标准管的吸光度

$A_{\text{空白}}$ = 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:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

- 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。

有效期: 6个月有效; 4℃运输, 4℃保存。

