

5'-核苷酸酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号: BA1696

产品规格: 100T/48S

产品简介:

5'-核苷酸酶(5'-NT)是一种对底物特异性不高的水解酶,可作用于多种核苷酸。广泛存在于各种植物、动物组织、血清血浆中。5'-NT是一种特殊的磷酸酯水解酶,它只作用于核苷-5'-磷酸如AMP(腺苷-5'-磷酸或腺苷酸)生成无机磷酸和核苷。通过定磷显色法测定所生成的无机磷含量,可以计算出5'-NT的活性高低。



注意:实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
提取液	液体30ml×1瓶	-20℃
试剂一	粉剂×2支	-20℃
试剂二	液体5ml×2瓶	2-8℃
试剂三	液体12ml×1瓶	2-8℃
试剂四	液体15ml×1瓶	2-8℃
试剂五	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂六	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂七	液体4ml×1瓶	室温
标准品	粉剂×1瓶	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂五:临用前加入4mL蒸馏水,充分溶解,用不完的试剂4℃保存两周。
2. 试剂六:临用前加入4mL蒸馏水,充分溶解,用不完的试剂4℃保存两周。
3. 工作液配制:临用前取1支试剂一中加入到1瓶试剂二中充分溶解;用不完的试剂-20℃分装保存一周,现用现配。
4. 定磷试剂的配制:按H₂O:试剂五:试剂六:试剂七=2:1:1:1的比例配制,配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效,若是蓝色则为磷污染(请根据需要,用多少配多少)。
5. 标准品:8mg磷标准品。临用前加入4.6mL试剂四溶解配制成10 μmol/mL的标准溶液,溶解后4℃保存两周。

需自备的仪器和用品:

天平、可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、低温离心机、恒温水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话:400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzybio@126.com

操作步骤（仅供参考）：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为1：5-10的比例（建议称取约0.05g，加入0.5mL提取液），冰上匀浆后于4℃，15000g离心10min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10⁴个）：蒸馏水体积（mL）为500-1000：1的比例（建议500万个细胞加入0.5mL蒸馏水），冰浴超声波破碎细胞（功率300W，超声3s，间隔7s，总时间3min）；然后4℃，15000g离心10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清：直接检测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。
2. 将标准品用试剂四稀释至0.96、0.48、0.24、0.12、0.06、0.03、0.015 μmol/mL标准液。
3. 标准品稀释表

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准液体积（μL）	试剂四体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	10	48	452	0.96
2	0.96	200	200	0.48
3	0.48	200	200	0.24
4	0.24	200	200	0.12
5	0.12	200	200	0.06
6	0.06	200	200	0.03
7	0.03	200	200	0.015

实验中每个标准管需80μL标准溶液。

4. 操作表（在1.5mL EP管中操作）

（1）酶促反应

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
工作液	80	-
漩涡混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（植物及其他）反应30 min		
试剂三	100	100
工作液	-	80
漩涡混匀，25℃，8000rpm离心10min，取上清进行显色反应		

（2）显色反应

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液	80	80	-	-
标准管	-	-	80	-
试剂四	-	-	-	80
定磷试剂	160	160	160	160
漩涡混匀，40℃显色10min；取200 μL反于微量玻璃比色皿/96孔板中，在660nm下测定吸光值A，分别记为A测定、A对照、A标准、A空白。 计算 ΔA标准=A标准-A空白，ΔA测定=A测定-A对照（空白管只需测定1-2次）。				



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

三、5'-NT活性计算

1. 标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为x轴, 其对应的 ΔA 标准为y轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 带入方程得到x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. 5'-NT活性的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义: 每mg组织蛋白在反应体系中每分钟产生1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$5\text{'-NT酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10^3 = 333.3 \times x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活单位定义: 每克组织在反应体系中每分钟产生1nmol无机磷定义为一个酶活单位。

$$5\text{'-NT酶活 (U/g质量)} = x \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10^3 = 166.67 \times x \div W$$

(3) 按细胞数计算:

酶活单位定义: 每 10^4 个细胞在反应体系中每分钟产生1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$5\text{'-NT酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{反总}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10^3 = 166.67 \times x \div \text{细胞数量}$$

(4) 按液体体积计算:

酶活单位定义: 每毫升液体在反应体系中每分钟产生1nmol无机磷定义为一个酶活性单位。

$$5\text{'-NT酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3 = 333.3 \times x$$

V样: 酶促反应中加入样本体积, 0.02mL; V反总: 酶促反应总体积, 0.2mL; V样总: 加入提取液的体积, 0.5mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量: 以万计; T: 酶促反应时间, 30 min; 10^3 : 单位换算, $1 \mu\text{mol} = 10^3 \text{nmol}$ 。

注意事项:

1. ΔA 测定大于1或者A测定管大于1时, 建议将样本用试剂四稀释后再进行测定。

实验实例:

1. 取0.05g小鼠肝, 进行样本处理, 取上清后按照测定步骤操作, 使用96孔板测得计算 ΔA 测定管=A测定-A对照=0.449-0.334=0.115, 带入标准曲线 $y=1.5514x+0.0038$, 计算 $x=0.0717$, 按照样本质量计算酶活得:
5'-NT酶活 (U/g质量) = $333.3 \times x \div W = 333.3 \times 0.0717 \div 0.1 = 238.98 \text{ U/g 质量}$ 。
2. 取0.05g稗草, 进行样本处理, 取上清后按照测定步骤操作, 使用96孔板测得计算 ΔA 测定管=A测定-A对照=0.245-0.196=0.049, 带入标准曲线 $y=1.5514x+0.0038$, 计算 $x=0.0291$, 按照样本质量计算酶活得:
5'-NT酶活 (U/g质量) = $333.3 \times x \div W = 333.3 \times 0.0291 \div 0.1 = 97.00 \text{ U/g质量}$ 。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com