

5'-核苷酸酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号: BA1641

产品规格: 50T/24S

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12ml×2瓶	2-8℃
试剂三	液体30ml×1瓶	2-8℃
试剂四	液体25ml×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12ml×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12mL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12mL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、台式离心机、低温离心机、恒温水浴锅/恒温培养箱、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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0.1g,加入1mL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1mL提取



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

液)，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10 min，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0.48、0.24、0.12、0.06、0.03、0.015 μmol/mL标准液。

3. 操作表（在1.5 mL EP管中操作）

（1）酶促反应

试剂名称（μl）	测定管	对照管
样本	100	100
工作液	400	
漩涡混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（植物及其他）反应30 min		
试剂三	500	500
工作液	-	400

（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	400	400	-	-
标准管	-	-	400	-
试剂四	-	-	-	400
定磷试剂	800	800	800	800
漩涡混匀，40℃显色10min；取1mL反应液于1mL玻璃比色皿中，在660 nm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）。				

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（μmol/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。

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

（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。

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

（3）按细胞数计算：

酶活单位定义：每10⁴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。

$$5'-NT酶活(U/10^4 cell) = x \times V_{反总} \div (细胞数量 \times V_{样} \div V_{样总}) \div T \times 10^3 = 333.3 \times x \div 细胞数量$$

（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。

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

V样：酶促反应中加入样本体积，0.1mL；V反总：酶促反应总体积，1mL；V样总：加入提取液的体积，1mL；

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；10³：单位换算，1 μmol=10³nmol。



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

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0.1g小鼠肝, 进行样本处理, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管=A测定-A对照=0.723-0.534=0.189, 带入标准曲线 $y=2.3928x+0.0165$, 计算 $x=0.0721$, 按照样本质量计算酶活得:
5'-NT酶活 (U/g质量) = $333.3 \times x \div W = 333.3 \times 0.0721 \div 0.1 = 240.31$ U/g 质量。
2. 取0.1g稗草, 进行样本处理, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管=A测定-A对照=0.367-0.281=0.086, 带入标准曲线 $y=2.3928x+0.0165$, 计算 $x=0.0290$, 按照样本质量计算酶活得:
5'-NT酶活 (U/g质量) = $333.3 \times x \div W = 333.3 \times 0.0290 \div 0.1 = 96.657$ 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

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com