

## 5'-核苷酸酶活性检测试剂盒微量法

中文名称：5'-核苷酸酶(5'-NT)活性检测试剂盒

英文名称：5'-nucleotidase(5'-NT)Activity Assay Kit

储存条件：-20℃

产品包装：盒装

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品规格：100T/48S

产品组成：

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

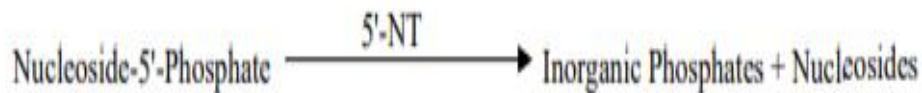
溶液的配制：

1、试剂五：临用前加入 4mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃保存两周。

- 2、试剂六：临用前加入 4 mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃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 H<sub>2</sub>O：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：8 mg 磷标准品。临用前加入 4.6 mL 试剂四溶解配制成 10μmol/mL 的标准溶液，溶解后 2-8℃保存。

#### 产品说明：

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。

#### 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。

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量）

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 0.05 g，加入 0.5 mL 提取液），冰上匀浆后于 4℃，15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10<sup>4</sup>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 300 W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3 min); 然后 4°C, 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 30 min 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  $\mu\text{mol/mL}$  标准液。

3、标准品稀释表

序号	稀释前浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )	标准液体积( $\mu\text{L}$ )	试剂四体积( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )
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 80 $\mu\text{L}$  标准溶液。

4、操作表 (在 1.5 mL EP 管中操作)

(1) 酶促反应

试剂名称( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管
样本	20	20
工作液	80	-
漩涡混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (植物及其他) 反应 30min		
试剂三	100	100
定磷试剂	-	80
漩涡混匀, 25°C, 8000 rpm 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	-	-
标准液	-	-	80	-
试剂四	-	-	-	80
定磷试剂	160	160	160	160

漩涡混匀, 40°C显色 10 min; 取 200μL 反应液于微量玻璃比色皿/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 $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白,  $\Delta A$  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. 标准曲线的建立:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的 $\Delta A$  标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y = kx + b$ , 将 $\Delta A$  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'-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'-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'-NT 酶活 (U/ $10^4$ 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'-NT 酶活 (U/mL) =  $x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 10^3$  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,  $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。 =  $333.3 \times x$

V 样: 酶促反应中加入样本体积, 0.02 mL; V 反总: 酶促反应总体积, 0.2 mL; 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, 30min;  $10^3$ : 单位换算,  $1\mu\text{mol} = 10^3\text{nmol}$ 。单位换算,  $1\mu$

mol =  $10^3\text{nmol}$ 。

**注意事项:**

1.  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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) =  $333.3 \times x \div W = 333.3 \times 0.0717 \div 0.1 = 238.98$  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  $\Delta$

A 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) =  $333.3 \times x \div W = 333.3 \times 0.0291 \div 0.1 = 97.00$  U/g 质量