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。

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，在测定管不加人抑制剂镍离子，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:

编号 / 名称	GCTE0261 100T	Storage
试剂(A): NT Assay Buffer Ⅰ	15ml	4℃
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℃
试剂(E): AMP 酸性缓冲液	50ml	RT 避光
试剂(F): 磷标准(6mmol/L)	1ml	4℃
试剂(G): 定磷酸性液	18ml	RT
试剂(H): 定磷还原液	3ml	4℃ 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

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℃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℃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℃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℃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,即为定磷工作液工作液,4℃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℃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。

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℃条件下 1L 血清与底物作用，1min 催化产生 1μmol 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)

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

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

组织、细胞中 5′-NT 活力计算公式：

组织、细胞 5′-NT 活力(U/mg)

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

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

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。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCCS0201	细胞线粒体分离试剂盒
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCNA0034	Tris-硼酸电泳缓冲液(5×TBE)
GCPT0001	BCA 蛋白定量试剂盒
GCPW0053	Western 抗体洗脱液(碱性)
GCTC1167	尿素(Urea)检测试剂盒(脲酶波氏比色法)