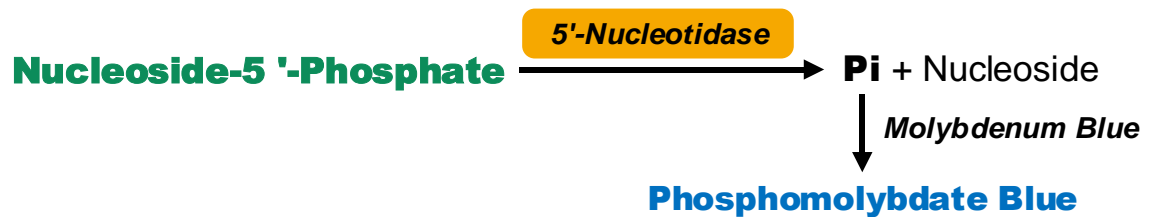




5'-核苷酸酶活性检测试剂盒

5'-Nucleotidase Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



5'-核苷酸酶活性检测试剂盒

5'-Nucleotidase Activity Assay Kit

一、产品描述

5'-核苷酸酶是一种对底物特异性不高的水解酶，广泛存在于各种植物、动物组织、血清血浆中，主要功能是参与核酸的分解代谢，在肝胆疾病和骨骼疾病诊断与鉴别诊断等领域具有重要应用。

5'-核苷酸酶能够催化核苷-5'-磷酸水解生成核苷和无机磷，无机磷在酸性条件下能够与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，经还原后生成蓝色磷钼蓝，产物在 660 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征 5'-核苷酸酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 30 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂一	粉剂×2 支	-20°C 保存	-
试剂二	液体 5 mL×2 瓶	4°C 保存	-
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 4°C 可保存 2 周)
试剂六	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 4 mL 蒸馏水充分溶解 (现用现配，配制后 4°C 可保存 2 周)
试剂七	液体 4 mL×1 瓶	RT 保存	-
标准品	粉剂×1 瓶 (8 mg 磷标准品)	4°C 保存	使用前加入 4.6 mL 试剂四充分溶解 (即为 10 μmol/mL 磷标准液)
标准稀释液的制备：使用前将 10 μmol/mL 磷标准液使用试剂四稀释至 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μmol/mL 即为标准稀释液。			

定磷剂的配制(根据使用量现用现配)：按试剂五：试剂六：试剂七：H₂O=1:1:1:2的体积比配制。

定磷剂正常应为浅黄色，若无色则试剂失效，若蓝色则为磷污染。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿(光径 10 mm)/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.05 g 组织，加入 0.5 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 0.5 mL 提取液）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2.测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm，蒸馏水调零。

②检测工作液的制备（现用现配）：使用前取一支试剂一加入一瓶试剂二中充分溶解。

③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
粗酶液	20	20	-	-
检测工作液	80	-	-	-
37°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）反应 30 min				
试剂三	100	100	-	-
检测工作液	-	80	-	-
充分混匀，8000 g 常温离心 10 min，取上清液				
上清液	80	80	-	-
标准稀释液	-	-	80	-
试剂四	-	-	-	80
定磷剂	160	160	160	160
充分混匀，40°C 显色 10 min				

吸光值测定：吸取 200 μL 反应液至 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 660 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：空白管只需测定 1-2 次，每个样品均需设一个对照管。

标准曲线的建立：以 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标（x），以其对应的 ΔA 标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定带入公式中得到 x（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

3. 5'-核苷酸酶 (5'-NT) 活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

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

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$5\text{'-NT (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times V_{\text{反总}} \times 10^3}{V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{166.7 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$5\text{'-NT (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{x \times V_{\text{样总}} \times V_{\text{反总}} \times 10^3}{V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{166.7 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol 无机磷所需酶量定义为一个酶活力单位。

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

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，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，0.5 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计；T：酶促反应时间，30 min； 10^3 ：单位换算， $1 \mu\text{mol} = 10^3 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

- ①若 A 测定大于 1.0，建议将粗酶液使用试剂四适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

