

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

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	4℃
试剂三	液体30ml×1瓶	4℃
试剂四	液体25ml×1瓶	4℃
试剂五	粉剂×1瓶	4℃
试剂六	粉剂×1瓶	4℃
试剂七	液体12ml×1瓶	室温
标准品	粉剂×1瓶	4℃

溶液的配制:

1. 试剂五: 临用前加入12 mL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12 mL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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 细胞：按照细胞数量（ 10^4 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。
- 血清：直接检测。

二、测定步骤

- 分光光度计预热30min以上，调节波长至660nm，蒸馏水调零。
- 将标准品用试剂四稀释至0.48、0.24、0.12、0.06、0.03、0.015 $\mu\text{mol/mL}$ 标准液。
- 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 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （空白管只需测定1-2次）。				

三、5'-NT活性计算

标准曲线的绘制：以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 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（ $\mu\text{mol/mL}$ ）。

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1 nmol无机磷定义为一个酶活单位。

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

(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。

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

(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1 nmol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，0.1mL；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； 10^3 ：单位换



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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0.1g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

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>