**5＇-核苷酸酶（5＇-NT）检测试剂盒（钼蓝微板法）**

**产品货号：**BA149

**产品规格：**100T

**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，不宜用于临床诊断或其他用途。

**产品组成：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 产品组成 | 100T | 保存条件 |
| 试剂(A): NT Assay bufferⅠ | 15ml | 室温 |
| 试剂(B): NT Assay buffer Ⅱ | 2ml | 室温 |
| 试剂(C): NT Assay buffer Ⅲ | 1ml | 室温 |
| 试剂(D): 5´-A MP buffer | 2ml | 4℃ |
| 试剂(E): AMP酸性缓冲液 | 50ml | 4℃，避光 |
| 试剂(F): 磷标准(6mmol/L) | 1ml | 4℃ |
| 试剂(G): 定磷酸性液 | 18ml | 室温 |
| 试剂(H): 定磷还原液 | 3ml | 4℃，避光 |
| 试剂(I): 钼酸铵溶液 | 3ml | 4℃ |

**需自备的仪器和用品：**

1. 蒸馏水、生理盐水
2. 离心管或EP管
3. 离心机、水浴锅
4. 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，可以直接用于本试剂盒的测定，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。

1. 配制对照NT Assay工作液：取适量的NT Assay bufferⅠ、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。
2. 配制测定NT Assay工作液：取适量的NT Assay bufferⅠ、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。
3. 配制磷标准工作液：取适量的磷标准(6mmol/L)，按磷标准(6mmol/L)：AM P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。
4. 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。
5. 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´-A MP 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。

1. 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 |

1. 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)｝×0.06×1000×N/(30×0.005)

=(A测定－A对照)/(A标准－A空白)×400×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)｝×0.06×N/(30×0.005×10 -3×待测样品蛋白浓度)

=(A测定－A对照)/(A标准－A空白)×400×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