

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,在测定管不加入抑制剂镍离子,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 buffer I	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'-AMP 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。



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

QQ: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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。
6. 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。

7. 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

8. 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 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$)。

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1 μmol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：

$$\text{血清5'-NT活力(U/L)} = \left\{ \frac{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \right\} \times 0.06 \times 1000 \times N / (30 \times 0.005)$$

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

组织、细胞中5'-NT活力计算公式：

$$\text{组织、细胞5'-NT活力(U/mg)} = \left\{ \frac{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \right\} \times 0.06 \times N / (30 \times 0.005 \times 10^{-3} \times \text{待测样品蛋白浓度})$$

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

式中： $A_{\text{测定}}$ =测定管的吸光度

$A_{\text{对照}}$ =对照管的吸光度

$A_{\text{标准}}$ =标准管的吸光度

$A_{\text{空白}}$ =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



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

QQ：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com