

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

名称	编号	ADS039TE0	Storage
		100T	
试剂(A):NT Assay Buffer I		15ml	4°C
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°C
试剂(E):AMP 酸性缓冲液		50ml	RT 避光
试剂(F):磷标准(6mmol/L)		1ml	4°C
试剂(G):定磷酸性液		18ml	RT
试剂(H):定磷还原液		3ml	4°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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, 4°C 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°C 水浴保温 5min。		
5'-AMP Buffer	0.01	0.01
混匀, 置于 37°C 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：

$$\begin{aligned} & \text{血清5'-NT活力(U/L)} \\ &= \{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})\} \times 0.06 \times 1000 \times N / (30 \times 0.005) \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 400 \times N \end{aligned}$$

组织、细胞中5'-NT活力计算公式：

$$\begin{aligned} & \text{组织、细胞5'-NT活力(U/mg)} \\ &= \{(A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})\} \times 0.06 \times N / (30 \times 0.005 \times 10^{-3} \times \text{待测样品蛋白浓度}) \\ &= (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 400 \times N / \text{待测样品蛋白浓度} \end{aligned}$$

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。

有效期: 6个月。低温运输，4℃保存