

## 5'-核苷酸酶活性检测试剂盒可见分光光度法

中文名称：**5'-核苷酸酶活性检测试剂盒可见分光光度法**

英文名称：5'-nucleotidase(5'-NT)Activity Assay Kit

储存条件：-20℃

产品包装：盒装

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品规格：50T/24S

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	-20℃保存
试剂一	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二	液体 12 mL×2 瓶	4℃保存
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂七	液体 12 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 瓶	4℃保存

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 H<sub>2</sub>O：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 4.6 mL 试剂四溶解配制成 10μmol/mL 的标准溶液，溶解后 4℃保存两周。

#### 产品说明：

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。

#### 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、1 mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量）

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 0.1 g，加入 1 mL 提取液），冰上匀浆后于 4℃，15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2. 细胞：按照细胞数量 (10<sup>4</sup> 个) : 蒸馏水体积 (mL) 为 500-1000 : 1 的比例（建议 500 万个细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min）；然后 4℃，15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。



3. 血清：直接检测。

## 二、测定步骤

1、分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 660 nm，蒸馏水调零。

2、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。

3、操作表（在 1.5 mL EP 管中操作）

试剂名称( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管
样本	100	100
工作液	400	
漩涡混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ （哺乳动物）或 25 $^{\circ}\text{C}$ （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( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	标准管	空白管
上清液	400	400	-	-
标准液	-	-	400	-
试剂四	-	-	-	400
定磷试剂	800	800	800	800
漩涡混匀，40 $^{\circ}\text{C}$ 显色 10 min；取 1mL 反应液于 1mL 玻璃比色皿中，在 660nm 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

### 1. 标准曲线的建立：

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  $\Delta A_{\text{测定}}$  带入方程得到 x ( $\mu\text{mol/mL}$ )。

### 2. 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'-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'-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 1 nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

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

$V_{\text{样}}$ : 酶促反应中加入样本体积, 0.1 mL;  $V_{\text{反总}}$ : 酶促反应总体积, 1 mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液的体积, 1 mL;  $W$ : 样本质量, g;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量: 以万计;  $T$ : 酶促反应时间, 30 min;  $10^3$ : 单位换算,  $1 \mu\text{mol} = 10^3 \text{nmol}$ 。

### 注意事项:

1.  $\Delta A$  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  $\Delta A$  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 $\Delta A$  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。