



5'-核苷酸酶活性检测试剂盒微量法

中文名称：**5'-核苷酸酶(5'-NT)活性检测试剂盒**

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：微量法

有效期：6个月

产品规格：100T/48S

产品内容：

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 5 mL×2 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂七	液体 4 mL×1 瓶	常温保存
标准品	粉剂×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1、试剂五：临用前加入 4mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃保存两周。



- 2、试剂六：临用前加入 4 mL 蒸馏水，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃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：8 mg 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 2-8℃保存。

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/酶标仪、台式离心机、低温离心机、恒温水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96 孔板、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 0.05 g，加入



0.5 mL 提取液)，冰上匀浆后于 4°C，15000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

2. 细胞：按照细胞数量 (10⁴个) : 蒸馏水体积 (mL) 为 500-1000 : 1 的比例 (建议 500 万个细胞加入 0.5mL 蒸馏水)，冰浴超声波破碎细胞 (功率 300 W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min)；然后 4°C，15000g 离心 10min，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/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零。

2、将标准品用试剂四稀释至 0.96、0.48、0.24、0.12、0.06、0.03、0.015 μmol/mL 标准液。

3、标准品稀释表

序号	稀释前浓度(μmol/mL)	标准液体积(μL)	试剂四体积(μL)	稀释后浓度(μmol/mL)
1	10	48	452	0.96
2	0.96	200	200	0.48
3	0.48	200	200	0.24
4	0.24	200	200	0.12
5	0.12	200	200	0.06
6	0.06	200	200	0.03
7	0.03	200	200	0.015

实验中每个标准管需 80μL 标准溶液。

4、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	20	20
工作液	80	-
漩涡混匀，37°C (哺乳动物) 或 25°C (植物及其他) 反应 30min		
试剂三	100	100



定磷试剂	-	80
漩涡混匀，25°C，8000 rpm 离心 10min，取上清进行显色反应		

(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	80	80	-	-
标准液	-	-	80	-
试剂四	-	-	-	80
定磷试剂	160	160	160	160

漩涡混匀，40°C显色 10 min；取 200μL 反应液于微量玻璃比色皿/96 孔板中，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ΔA 标准=A 标准-A 空白，ΔA 测定=A 测定-A 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ΔA 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 (μmol/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 1nmol 无机磷定义为一个酶活单位。
5'-NT 酶活 (U/g 质量) = $x \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 10^3 = 166.67 \times x \div W$

(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'-NT 酶活 (U/10⁴cell) = x × V 反总 ÷ (细胞数量 × V 样 ÷ V 样总) ÷ T × 10³ = 166.67 × x ÷ 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 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位。

5'-NT 酶活 (U/mL) = x × V 反总 ÷ V 样 ÷ T × 10 样本蛋白浓度, mg/mL; 细胞数量：以万计；

T：酶促反应时间，30 min；10³：单位换算，1μmol=10³nmol。=333.3 × x

V 样：酶促反应中加入样本体积，0.02 mL；V 反总：酶促反应总体积，0.2 mL；V 样总：

加入提取液的体积，0.5mL；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，30min；10³：单位换算，1μmol=10³nmol。单位换算，1μmol=10³nmol。

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 0.05g 小鼠肝，进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定管=A 测定-A 对照=0.449-0.334=0.115，带入标准曲线 y=1.5514x+0.0038，计算 x=0.0717，按照样本质量计算酶活得：

5'-NT 酶活 (U/g 质量) = 333.3 × x ÷ W = 333.3 × 0.0717 ÷ 0.1 = 238.98 U/g 质量。

2、取 0.05g 稗草，进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定管=A 测定-A 对照 = 0.245-0.196=0.049，带入标准曲线 y=1.5514x+0.0038，计算 x=0.0291，按照样本质量计算酶活得：

5'-NT 酶活 (U/g 质量) = 333.3 × x ÷ W = 333.3 × 0.0291 ÷ 0.1 = 97.00 U/g 质量