（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K196-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(550 nm)

Elabscience®5’-核苷酸酶(5’-NT)比色法测试盒

5'-Nueleotidase (5'-NT) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本或血清血浆样本中 5’-核苷酸酶活力。

检测原理

5′-NT 水解次黄苷-5′-单磷酸盐 (5'-IMP)，生成次黄苷，在嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)存在下，后者转化为次黄嘌呤，次黄嘌呤经黄嘌呤氧化酶作用，次黄嘌呤转化为尿酸和 H_2O_2，H_2O_2 在过氧化物酶(POD)存在下与色原和 4-氨基安替比林(4-APP)反应生成有色醌，在波长 550 nm 处检测吸光度增长速率，计算得到 5’-核苷酸酶活力。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	工作液 (Working Solution)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 (Chromogenic Agent)	5 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	2-8°C 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	0.6 mmol/L 次黄苷标准品溶液 (0.6 mmol/L Inosine Standard Solution)	2 mL×1 瓶	2 mL×1 瓶	2-8°C 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪（550 nm）、恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)。

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.12**	**0.24**	**0.30**	**0.36**	**0.42**	**0.48**	**0.60**
0.6 mmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：可直接测定。

组织样本：匀浆介质是生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆离心后取上清进行测定，留取部分上清测蛋白。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：28.0-581 U/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠脑组织	不稀释	大鼠血浆	不稀释
10%大鼠肝组织	2-5	狗血清	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	人血清	不稀释
10%大鼠肾组织	2-5	小鼠血浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9% NaCl）。

实验关键点

① 待测样本加入酶标板时，触底加入。

② 加入试剂二时，应尽快加入酶标板对应检测孔，使用多道移液枪加试剂二更佳，减少各孔之间的误差。

③ 孵育过程中，酶标板注意避光。

操作步骤

① 标准孔：取 10 μL 不同浓度标准品加入酶标板相应标准孔中，

测定孔：取 10 μL 待测样本加入酶标板相应测定孔中。

② 向步骤①各孔中加入 180 μL 试剂一，37°C 孵育 5 min。

③ 向步骤②各孔中加入 90 μL 试剂二。

④ 37°C 孵育 10 min，酶标仪于 550 nm 处，检测测定孔吸光度 A_1。

⑤ 37°C 孵育 10 min，再次检测测定孔与标准孔吸光度 A_2。

注：移液枪移取液体时，小心吸打，避免产生气泡；标准孔只需要检测 A_2，测定孔需要检测 A_1 与 A_2。

操作表

	标准孔	**测定孔**
待测样本(μL)	--	10
不同浓度标准品(μL)	10	--
试剂一(μL)	180	180
37°C 孵育 5 min		
试剂二(μL)	90	90
37°C 下孵育 10 min，酶标仪于 550 nm 处，检测测定孔吸光度，记为 A_1		
继续在 37°C 下孵育 10 min，再次检测测定孔与标准孔吸光度，记为 A_2。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织样本中 5'-核苷酸酶活力计算公式：

定义： 37°C 条件下，每克组织蛋白每 10 分钟催化底物产生 1 μmol 次黄苷的所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{5'-核苷酸酶活力 (U/gprot)} = (A_2 - A_1 - b) \div a \times 1000^* \div C_{pr}$$

血清(浆)样本中 5'-核苷酸酶活力计算公式：

定义： 37°C 条件下，每升血清(浆)每 10 分钟催化底物产生 1 μmol 次黄苷的所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{5'-核苷酸酶活力 (U/L)} = (A_2 - A_1 - b) \div a \times 1000^* \times f$$

注解:

y：标准测定 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

A_1：第一次孵育 10 min，待测样本吸光度

A_2：第二次孵育 10 min，待测样本吸光度

1000*：单位换算 1 mmol=1000 μmoL

C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

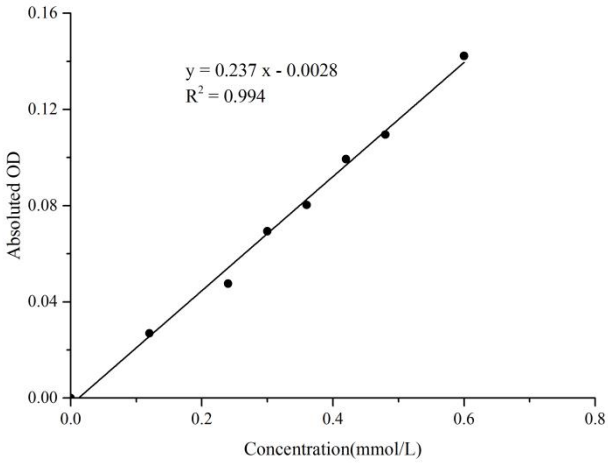
检测范围	28.0-581 U/L	平均批间差	6.0 %
灵敏度	28.0 U/L	平均批内差	3.3 %
平均回收率	105 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，于酶标仪550 nm处测得吸光度A_2，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0.00	0.12	0.24	0.30	0.36	0.42	0.48	0.60
OD 值	0.046	0.073	0.100	0.116	0.126	0.143	0.153	0.192
	0.045	0.072	0.087	0.115	0.126	0.147	0.158	0.184
平均 OD 值	0.046	0.073	0.093	0.115	0.126	0.145	0.155	0.188
绝对 OD 值	0.000	0.027	0.048	0.069	0.080	0.099	0.110	0.142

②绘制标曲(如下图)：



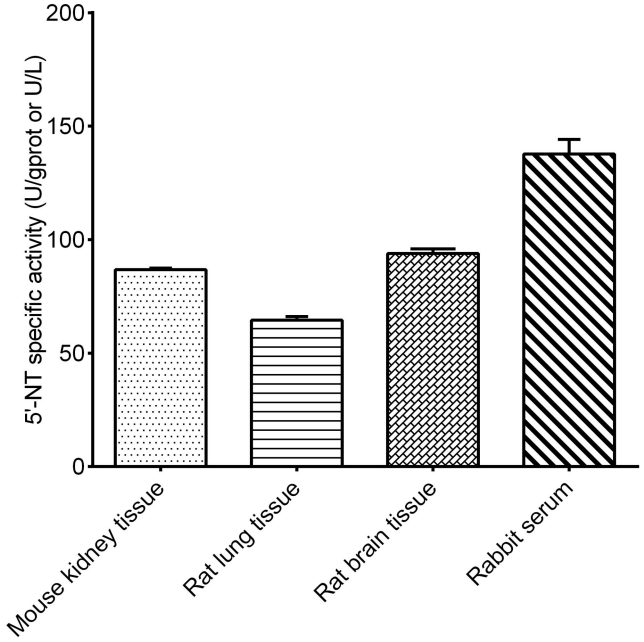
附录2 实例分析

例如检测10%小鼠肾组织匀浆样本(数据仅供参考)：

取10 μL待测匀浆样本按说明书进行测定，结果如下：标准曲线：y = 0.298 x - 0.0034，：第一次孵育10 min，待测样本吸光度A_1：0.193，第二次孵育10 min，待测样本吸光度A_2：0.307，样本蛋白浓度为4.54 gprot/L，待测样本含量计算结果为：

$$\text{5'-核苷酸酶含量 (U/gprot)} = (0.307 - 0.193 + 0.0034) \div 0.298 \div 4.54 \times 1000 = 86.77\ \text{U/gprot}$$

按照说明书操作，测定小鼠肾组织(10%匀浆蛋白浓度为4.54 gprot/L，加样量10 μL)、大鼠肺组织(10%匀浆蛋白浓度为6.35 gprot/L，加样量10 μL)、大鼠脑组织(10%匀浆蛋白浓度为3.11 gprot/L，加样量10 μL)和兔血清(加样量10 μL)中5’-核苷酸酶活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本检测不出值	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
OD 值未发生变化	反应体系未孵育	按说明书上操作步骤进行孵育

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Zhang X, He C, Chen Y, et al. Cyclic reactions-mediated self-supply of H2O2 and O2 for cooperative chemodynamic/starvation cancer therapy[J]. Biomaterials, 2021, 275:120987-. IF:12.479
2. Xia H, Scholtes C, Dufour CR, et al. Insulin action and resistance are dependent on a GSK3β-FBXW7-ERRα transcriptional axis. Nat Commun. 2022; 13 (1):2105. IF:14.919
3. Liu Q, Zhang T X, Zheng Y D, et al. Calixarene-Embedded Nanoparticles for Interference-Free Gene–Drug Combination Cancer Therapy[J]. Small, 2021, 2006223. IF:11.459
4. He C, Zhang X, Chen C, et al. A solid lipid coated calcium peroxide nanocarrier enables combined cancer chemo/chemodynamic therapy with O2/H2O2 self-sufficiency[J]. Acta Biomaterialia, 2021, 122. IF:8.203
5. Chen L, Tao F, Zhang Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 accelerates liver regeneration by downregulating Tgfbr1 and attenuating Tgfβsignaling in mice[J]. FEBS Letters, 2020, 594(17). IF:6.665
6. Omar N, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or Without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2021:2001133. IF:5.914
7. Wang C, Ma C, Fu K, et al. Phillygenin Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis via Modulating Inflammation and Gut Microbiota[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 9, 21. IF:5.81
8. Du Y Q, Zheng Y Z, Yu C X M, et al. The Mechanisms of Yu Ping Feng San in Tracking the Cisplatin-Resistance by Regulating ATP-Binding Cassette Transporter and Glutathione S-Transferase in Lung Cancer Cells[J].Frontiers in Pharmacology, 2021; 12: 678126. IF:5.81
9. Zeng X Peng, Wang L J, Guo L H, et al. Dasatinib ameliorates chronic pancreatitis induced by caerulein via anti- fibrotic and anti-inflammatory mechanism[J]. Pharmacological Research, 2019, 147, 104357. IF:5.574
10. Cao X, Liang Y, Liu R, et al. Uncovering the Pharmacological Mechanisms of Gexia-Zhuyu Formula (GXZY) in Treating Liver Cirrhosis by an Integrative Pharmacology Strategy. Front Pharmacol. 2022; 13:793888. IF:5.331
11. Wang Y, Xie W, Feng Y, et al. Epithelial-derived exosomes promote M2 macrophage

polarization via Notch2/SOCS1 during mechanical ventilation. Int J Mol Med. 2022; 50 (1). IF:5.314

12. Jung D S, Son Y J, Shin J M, et al. Gymnaster Koraiensis Extract Alleviated Metabolic Syndrome Symptoms and Stimulated UCP1-Independent Energy Consumption via AMPK Activation in White Adipose Tissue[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2020. IF:5.309
13. Ali A K, Komal A K, Almutairi S M, et al. Natural killer cell-derived IL-10 prevents liver damage during sustained murine cytomegalovirus infection[J]. Frontiers in immunology, 2019, 10: 2688. IF:5.085
14. Xu Y , Zhang Y , Xu Y , et al. Activation of CD137 signaling promotes macrophage apoptosis dependent on p38 MAPK pathway-mediated mitochondrial fission[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2021 Jul;136:106003. IF:5.085
15. Naseh A, Shirin B, Maryam M,et al.Attenuation of chronic arsenic neurotoxicity via melatonin in male offspring of maternal rats exposed to arsenic during conception: Involvement of oxidative DNA damage and inflammatory signaling cascades[J]. Life Sciences 266 (2021) 118876. IF:5.037
16. Ahmed A E, Alshehri A, Al-Kahtani M A, et al. Vitamin E and selenium administration synergistically mitigates ivermectin and doramectin-induced testicular dysfunction in male Wistar albino rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 124: 109841. IF:4.545
17. Su S, Tian H, Jia X, et al. Mechanistic insights into the effects of SREBP1c on hepatic stellate cell and liver fibrosis[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. IF:4.486
18. Wang L J, He L, Hao L, et al. Isoliquiritigenin ameliorates caerulein-induced chronic pancreatitis by inhibiting the activation of PSCs and pancreatic infiltration of macrophages[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020. IF:4.486
19. Dejan Lazić, Andreas Scheurer, Dušan Ćoćić, et al. New bis-pyrazolylpyridine ruthenium(III) complex as a potential anticancer drug: In vitro and in vivo activity in murine colon cancer[J]. Dalton Transactions, 2021 Jun; 50(22):7686-7704. IF:4.39
20. Li X, Lv Z, Chen J, et al. Bacillus amyloliquefaciens B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 151:112124. IF:4.06