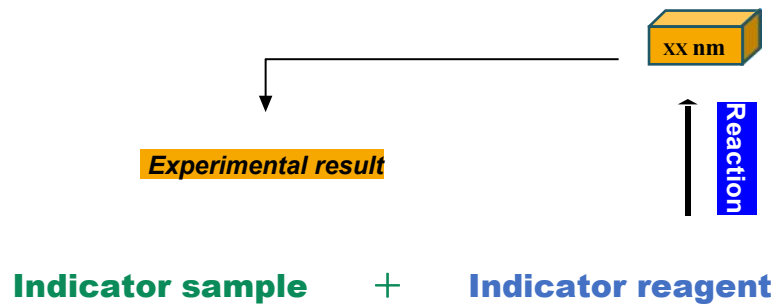


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, AS) 活性测定试剂盒说明书 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

天冬酰胺合成酶是广泛存在于生物体内的一类氨基转移酶，催化谷氨酰胺的氨基向天冬氨酸转移。当植物处于氨毒时天冬酰胺的形成是一种解毒反应。

测定原理：

AS 催化 L-天冬酰胺水解成 L-天冬氨酸和氨，利用奈氏试剂检测氨增加的速率，即可计算其酶活性。

需自备仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	60 mL*2瓶	4 °C 保存	
试剂二	40mL 一瓶	4 °C 保存	
试剂三	60mL 一瓶	常温保存	
试剂四	5 mL 一瓶	常温保存	
试剂五	3ml 一瓶	常温保存	
试剂六	3ml 一瓶	温避光保存	

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 420nm, 蒸馏水调零。
- 2、样品测定 (在 EP 管中加入下列试剂):

试剂名称 (uL)	测定管	对照管
样本	25	
蒸馏水		25
试剂一	100	100
试剂二	400	400

混匀, 37°C 水浴 1 小时

试剂三	525	525
-----	-----	-----

混匀, 8000 g, 25°C 离心 10 min; 取上清液, 在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂

上清液	130	130
试剂四	30	30
试剂五	20	20
试剂六	20	20

混匀, 室温静置 15min, 420nm 处读取测定管和对照管吸光值, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。对照管只要做一管。

注意: 试剂六如出现沉淀, 静置后取上清使用。

酶活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.662x - 0.0434$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值 A 。1、血清 (浆) AS 活性

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS } (\mu\text{g/h/mL}) = (\Delta A + 0.0434) \div 0.662 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 31.722 \times (\Delta A + 0.0434)$$

2、组织、细菌或细胞中 AS 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS 活力 } (\mu\text{g/h/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0434) \div 0.662 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 31.722 \times (\Delta A + 0.0434) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS 活力 } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0434) \div 0.662 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 31.722 \times (\Delta A + 0.0434) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS 活力 } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0434) \div 0.662 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.0634 \times (\Delta A + 0.0434) \end{aligned}$$

T: 反应时间, 1h; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积: 0.525mL; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中样本体积, 0.025mL; $V_{\text{样总}}$: 提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.3046x - 0.0097$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$), y 为吸光值 A 。

1、血清 (浆) AS 活力的计算:

单位的定义: 每 mL 血清 (浆) 每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS 活力 } (\mu\text{g/h/mL}) = (\Delta A + 0.0097) \div 0.3046 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 68.94 \times (\Delta A + 0.0097)$$

2、组织、细菌或细胞中 AS 活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS 活力 } (\mu\text{g/h/mg prot}) &= (\Delta A + 0.0097) \div 0.3046 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 68.94 \times (\Delta A + 0.0097) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS 活力 } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0097) \div 0.3046 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 68.94 \times (\Delta A + 0.0097) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每小时产生 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS 活力 } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0097) \div 0.3046 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.1379 \times (\Delta A + 0.0097) \end{aligned}$$

T: 反应时间, 1h; V 反总: 反应体系总体积: 0.525mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.025mL; V 样总: 提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。