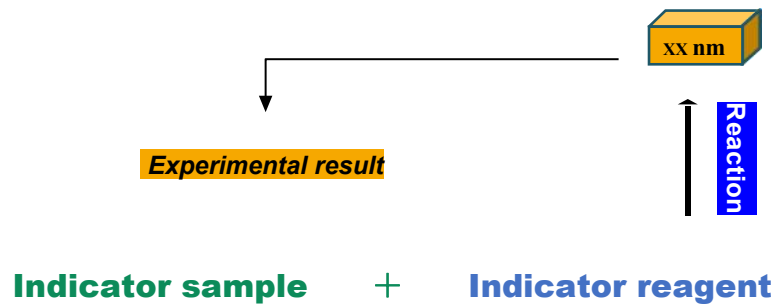


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



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

### 分光光度法

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、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

#### ：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 | 液体 60mL×1 瓶  | 4 °C保存   |                               |
| 试剂二 | 粉剂×2 瓶       | 4 °C避光保存 | 临用前每瓶加入 12.5mL 蒸馏水充分溶解待用，现配现用 |
| 试剂三 | 液体 30 mL×1 瓶 | 常温保存     |                               |
| 试剂四 | 液体 10 mL×1 瓶 | 常温保存     |                               |
| 试剂五 | 液体 6 mL×1 瓶  | 常温保存     |                               |
| 试剂六 | 液体6 mL×1瓶    | 常温避光保存   |                               |

#### 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，蒸馏水调零。

2、样品测定（在 EP 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 管中加入下列试剂

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 上清液 | 650 | 650 |
| 试剂四 | 150 | 150 |
| 试剂五 | 100 | 100 |
| 试剂六 | 100 | 100 |

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

1、试剂六如出现沉淀，静置后取上清使用。

2、 $\Delta A$  ( $A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ) 若出现负值，可能是酶活性较低，可将反应时间 1h 延长到 2h，相应的在计算公式中除以 2。

酶活性计算：

标准条件下测定的回归方程为  $y = 3.8488x + 0.0057$ ， $R^2 = 0.9983$ ；；x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 为吸光值 A。

1、血清（浆）AS 活性

单位定义：每 mL 血清（浆）每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS (nmol /min /mL)} = (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 181.8 \times (\Delta A - 0.0057)$$

2、组织、细菌或细胞 AS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 蛋白质每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS (nmol /min /mg prot)} &= (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{AS (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} AS (\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 0.3637 \times (\Delta A - 0.0057) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，60min；V 反总：反应体系总体积，1.05mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.025mL；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；1000， $\mu\text{mol}$  到  $\text{nmol}$  换算系数。