

使用说明书

Instruction Manual

天冬酰胺合成酶活性检测试剂盒（微量法）

Asparagine synthase Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

天冬酰胺合成酶（Asparagine synthase, AS）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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0031M-A	60mL×2 瓶	4℃保存。
CB0031M-B	40mL×1 瓶	4℃保存。
CB0031M-C	60mL×1 瓶	常温保存。
CB0031M-E	1mL×1 瓶	常温保存。
CB0031M-F	1mL×1 瓶	常温避光保存，如出现沉淀，静置后取上清使用。
CB0031M-Standard (1mg/mL)	1mL×1 瓶	4℃保存。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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

二、粗酶液提取：

- 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）：CB0031M-A 体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0031M-A），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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 组织：按照组织质量（g）：CB0031M-A 体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL CB0031M-A），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 血清（浆）等液体样品：直接测定。

三、测定步骤：

- 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。
- 标准品准备：临用前用蒸馏水将标准品稀释至 5、4、3、2、1、0.5、0 μ g/mL。
- 样本测定（按下表在 96 孔板中加入如下试剂）：

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)
样本	25		
蒸馏水		25	
CB0031M-A	100	100	
CB0031M-B	400	400	
混匀，37℃水浴 1 小时。			
CB0031M-C	525	525	
混匀，8000 g，25℃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	190	190	
标准品			190
CB0031M-D	4	4	4
CB0031M-E	6	6	6
混匀，室温静置 10min，420nm 处读取吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。			

注：对照管和标准曲线各只要做 1-2 次。

四、AS 酶活性计算：

1. 标准条件的建立：

以浓度 (x) 为横坐标，标准品吸光度 (y) 为纵坐标建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA ($\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$) 带入公式中计算样本浓度 x (μg/mL)。

2. 血清（浆）AS 活性计算：

单位定义：每 mL 血清（浆）每小时产生 1μg 氮定义为一个酶活力单位。

$$AS (U/mL) = x \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 21x$$

3. 组织、细菌或细胞中 AS 活性计算：

（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 1μg 氮定义为一个酶活力单位。

$$AS \text{ 活力 } (U/mg \text{ prot}) = x \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 21x \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每小时产生 1μg 氮定义为一个酶活力单位。

$$AS \text{ 活力 } (U/g \text{ 鲜重}) = x \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 21x \div W$$

（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 1μg 氮定义为一个酶活力单位。

$$AS \text{ 活力 } (U/10^4 \text{ cell}) = x \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.042x$$

注：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。

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

