



天冬酰胺合成酶活性检测试剂盒 Asparagine synthase Assay Kit

微量法

产品编号: AK382M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK382-A	60 mL×2 瓶	4℃保存;
AK382-B	40 mL×1 瓶	4℃保存;
AK382-C	60 mL×1 瓶	常温保存;
AK382-E	1 mL×1 瓶	常温保存;
AK382-F	1 mL×1 瓶	常温避光保存, 如出现沉淀, 静置后取上清使用;
AK382-标准品 (1mg/ml)	1 mL×1 瓶	4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

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。

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。

粗酶液提取:

1. 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): AK382-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL AK382-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。
2. 组织: 按照组织质量 (g): AK382-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK382-A), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 等液体样品: 直接测定。

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. 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。
3. 样本测定 (按下表在 96 孔板中加入如下试剂)

试剂名称 (uL)	测定管 (uL)	对照管 (uL)	标准管 (uL)
样本	25		
蒸馏水		25	
AK382-A	100	100	
AK382-B	400	400	
混匀, 37℃ 水浴 1 小时			
AK382-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
AK382-D	4	4	4
AK382-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。

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 ($\mu\text{g/mL}$)。

2. 血清 (浆) AS 活性计算：

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。

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

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 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算：

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

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

(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 $1\mu\text{g}$ 氮定义为一个酶活力单位。

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

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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))