

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

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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。

### 组成：

产品名称	NM012-100T/96S	Storage
试剂一：液体	60 ml	4°C
试剂二：液体	40ml	4°C
试剂三：液体	60 ml	常温
试剂四：液体	5 ml	常温
试剂五：液体	3 ml	常温
试剂六：液体	3 ml	常温避光
说明书	一份	

### 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。

### 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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



### 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 (μl)	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  $1\mu\text{g}$  氨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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

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

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

(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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

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

$T$ : 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;  $C_{\text{pr}}$ : 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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算:

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

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

(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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

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

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;  $C_{\text{pr}}$ : 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。

