

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 50 管/48 样

注 意：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。

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。

试剂组成和配制：

试剂一×1 瓶，60 mL，4 °C 保存；

试剂二×1 瓶，20 mL，4 °C 保存；

试剂三×1 瓶，30 mL，常温保存；

试剂四×1 瓶，10 mL，常温保存；

试剂五×1 瓶，6 mL，常温保存；

试剂六×1 瓶，6 mL，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℃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℃水浴 1 小时

试剂三	525	525
-----	-----	-----

混匀，8000 g，25℃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：试剂六如出现沉淀，静置后取上清使用。

计算：

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 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

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

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 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每小时产生 1 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

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

(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 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

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

T: 反应时间, 1h; V 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