



天冬酰胺酶(ASNase/asparaginase)活性测定试剂盒

可见分光光度法

货号: R43907-48S

产品简介:

天冬酰胺酶(EC 3.5.1.1,ASNase) 是一种酰胺水解酶, 能够将L-天冬酰胺脱去氨基生成L-天冬氨酸和氨。该酶具有抗肿瘤活性, 在食品和医药等领域应用十分广泛。

天冬酰胺酶 (ASNase) 催化天冬酰胺水解成天冬氨酸和氨, 利用氨在强碱的环境下与次氯酸盐和苯酚作用, 生成水溶性染料靛酚蓝, 溶液颜色稳定。其在630nm处有特征吸收峰, 通过检测氨增加的速率, 即可计算该酶活性大小。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂mg×2瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 11mL蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	液体24mL×1瓶	4℃保存	
试剂五	液体12mL×1瓶	4℃保存	
试剂六	A:液体7mL×4瓶 B:液体μL×1支	4℃保存	临用前取60μL的B液进一瓶A液中, 混匀后作为试剂六使用。混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体mL×1支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该标曲。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、台式离心机、可调式移液枪、研钵。



天冬酰胺酶 (ASNase) 活性测定:

1、样本制备:

①组织样本: 称取约0.1g 组织(水分足的样本可取0.2-0.5g), 加入1mL 提取液; 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:也可以按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取。

②细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约500万细菌或细胞加入1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次); 12000rpm 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

③液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

①分光光度计预热30min 以上, 调节波长至630nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃), 在EP管依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	200	200
试剂二	200	
试剂三		200
混匀, 放入37℃水浴锅或恒温培养箱中孵育1h		
试剂二		200
试剂三	200	
混匀, 室温12000rpm离心10min, 上清液待测。		

③显色反应: 在EP管中依次加入:

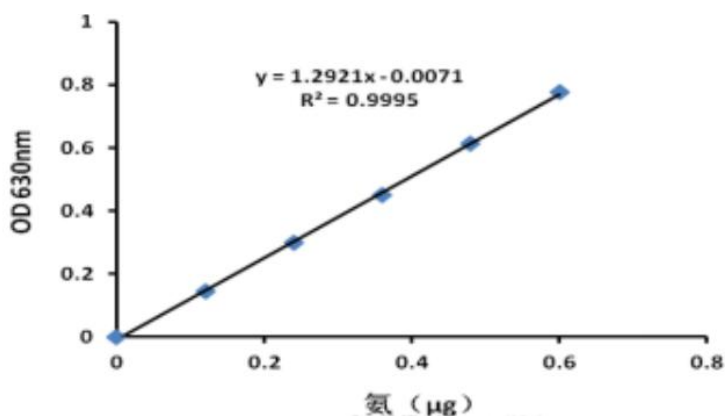
试剂名称(μL)	测定管	对照管
上清液(上步反应)	60	60
蒸馏水	180	180
试剂四	240	240
试剂五	120	120



试剂六	240	240
分混匀, 37℃放置20min后, 全部液体转移至1mL玻璃比色皿(光径1cm)中, 于630nm处读取吸光值A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 1.2921x - 0.0071$; x 为标准品质量(μg), y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白质每小时催化天冬酰胺生成 $1\mu\text{g}$ 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div C_{\text{pr}}$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每小时催化天冬酰胺生成 $1\mu\text{g}$ 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T$$
$$= 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div W$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10^4 个细胞每小时催化天冬酰胺生成 $1\mu\text{g}$ 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h}/10^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T$$
$$= 0.22 \times (\Delta A + 0.0071)$$

5、按照液体体积计算:



单位定义: 每毫升液体每小时催化天冬酰胺生成1 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{ASNase } (\mu\text{g/h/mL}) &= (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div V1 \div T \\ &= 110 \times (\Delta A + 0.0071)\end{aligned}$$

V-- 提取液体积, 1mL;

V1-----加入②步反应体系中样本体积, 0.08mL;

V2---② 步反应体系总体积: 0.68mL;

V3---③ 步显色步骤中上清液体积, 0.06mL;

T---反应时间, 1h;

W---样本质量;

Cpr--- 样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1.标准品母液(10 μ g/mL 的氨),把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0,2,4, 6,8,10 μ g/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 2.按照显色反应阶段的测定管加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。