



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

天冬酰胺合成酶活性检测试剂盒(见分光光度法)

货号: R42025

规格: 50T/48S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	60 mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	20 mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-C	30 mL×1瓶	常温保存;
试剂-D	2 mL×1瓶	常温保存;
试剂-E	2 mL×1瓶	常温避光保存, 如出现沉淀, 静置后取上清使用
标准品 (1mg/ml)	1 mL×1瓶	2-8℃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:

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。

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): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂-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): 试剂-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂-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 $\mu\text{g/mL}$ 。
3. 样品测定 (在 EP 中加入下列试剂):

试剂名称(uL)	测定管(uL)	对照管(uL)	标准管(uL)
样本	25		
蒸馏水		25	
试剂-A	100	100	
试剂-B	400	400	
混匀, 37℃水浴1小时			
试剂-C	525	525	
混匀, 8000 g, 25℃离心 10 min; 取上清液, 按下表加入下列试剂			
上清液	950	950	
标准液			950
试剂-D	20	20	20
试剂-E	30	30	30
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 $1\mu\text{g}$ 氨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 $1\mu\text{g}$ 氨定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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 $1\mu\text{g}$ 氨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