

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。

需自备仪器和用品:

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。

试剂组成和配制:

试剂一:液体 60mL×2 瓶,4 °C 保存;

试剂二:粉剂×2 瓶,4 °C 避光保存;临用前每瓶加入 25mL 蒸馏水充分溶解待用,现配现用;

试剂三:液体 60 mL×1 瓶,常温保存;

试剂四:液体 5 mL×1 瓶,常温保存;

试剂五:液体 3 mL×1 瓶,常温保存;

试剂六:液体 3 mL×1 瓶,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(10⁴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。

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 (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°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：

- 1、试剂六如出现沉淀，静置后取上清使用。
- 2、 ΔA ($A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$) 若出现负值，可能是酶活性较低，可将反应时间 1h 延长到 2h，相应的在计算公式中除以 2。

酶活性计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.9244x + 0.0057$, $R^2 = 0.9983$; x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值 A。

1、血清（浆）AS 活性

单位定义：每 mL 血清（浆）每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS (nmol/min/mL)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057)$$

2、组织、细菌或细胞 AS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 蛋白质每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS (nmol/min/mg prot)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{AS (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 0.7274 \times (\Delta A - 0.0057)$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，60min；V 反总：反应体系总体积，1.05mL；

V 样：加入反应体系中样本体积，0.025mL；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；1000， μmol 到 nmol 换算系数。

a.