

天冬酰胺合成酶 (Asparagine Synthetase, AS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-AJS015-48 分光法 48 样)

一、产品简介:

天冬酰胺合成酶 (AS, EC 6.3.5.4) 广泛存在于植物和微生物体内, 是一个以氨或谷氨酰胺及天冬氨酸为底物催化合成天冬酰胺的关键酶, 该酶对于研究植物营养有重要意义,

天冬酰胺合成酶 (AS) 催化谷氨酰胺的氨基转移到天冬氨酸形成天冬酰胺, 同时生成谷氨酸; 利用谷氨酸脱氢酶作用于生成的谷氨酸, 同时使 NAD^+ 还原成 NADH, 通过测定 NADH 在 340nm 处的增加速率, 进而得出天冬酰胺合成酶活性大小。

该酶催化反应: $\text{ATP} + \text{L-aspartate} + \text{L-glutamine} + \text{H}_2\text{O} = \text{AMP} + \text{diphosphate} + \text{L-asparagine} + \text{L-glutamate}$ 。

二、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	粉体 1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 1 瓶	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉体 1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	粉体 2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每支加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、天冬酰胺合成酶 (AS) 活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分多的样本取 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】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (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。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	150	150
试剂一	50	50
试剂二	50	50
试剂三	50	50
试剂四	50	
试剂五	250	300
混匀，37°C下孵育 20 分钟		
95°C沸水浴 3 分钟，上下混匀后，12000rpm 离心 5 分钟，上清液待测。		

- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
②步上清液	300	300
试剂五	300	300
试剂六	80	80
试剂七	20	20
混匀，37°C下孵育 20 分钟，全部液体转移至 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中，于 340nm 处读吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需设一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 差值在零附近，可在③反应阶段增加上清液（V3）的量（如增加到 400-500μL，则试剂五相应减少）；或延长第②步中 37°C反应时间 T（如由 20min 增加至 40min）；或增加②步中样本加样体积 V1（如由 150μL 增至 250μL，则试剂五相应减少）；则改变后的 V3 或 T 或 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$AS(\text{nmol NADH}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_4 \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T$$

$$= 75 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$AS(\text{nmol NADH}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_4 \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 75 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$AS(\text{nmol NADH}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_4 \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 75 \times \Delta A \div 500$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V2---②步反应体系总体积， 6×10^4 L；

V4---③步反应体系总体积， 7×10^4 L；

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；

W---样本质量，g；

V1---②步中加入样本体积，0.15mL；

V3---③反应阶段中上清液， 3×10^4 L；

d---光径，1cm；

500---细胞数量，万；

T---反应时间，20min；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL) , 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

