

天冬酰胺(L-Asparagine,Asn)含量测定试剂盒说明书

(货号：ADS-F-AJS019-48 紫外分光光度法 48 样 有效期：3 个月)

一、指标介绍：

天冬酰胺 (Asn) 是 20 种天然氨基酸之一，被所有生物用于蛋白质合成。在人类中是一种非必需氨基酸，因为它可以在体内由天冬氨酸和谷氨酰胺合成。

本试剂盒利用天冬酰胺酶使天冬酰胺分解成天冬氨酸和 NH_4^+ ，接着在谷氨酸脱氢酶作用下使 NH_4^+ 和 α -酮戊二酸反应，同时使 NADH 氧化，通过检测 NADH 在特异吸收波长 340nm 处的下降量，进而计算出天冬酰胺 (Asn) 的含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 2 支	-20℃避光保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用； 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	粉体 1 支	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；
试剂三	粉体 1 支	-20℃保存	2. 分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1mL 蒸馏水混匀备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	1. 此标准品不参与计算，仅用来验证试剂是否正常； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

① 组织样本：0.1g 组织样本（水分充足的样本建议取 0.5g 左右），加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，离心 10min，上清液待测。

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 液体样品：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则 12000rpm，离心 10min 取上清液待测。

2、检测步骤：

- ① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）
- ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管
样本	60
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	600
混匀，室温（25℃）条件下孵育 10min，于 340nm 处读取 A1。	
试剂五	20
混匀，室温（25℃）条件下孵育 10min，于 340nm 处读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】1.若 ΔA 值在零附近，可增加样本取样质量W或增加样本加样体积V1（如增至40μL，则试剂四相应减少），则改变后的W和V1需代入计算公式重新计算。

2.若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样体积 V1（如减至 10μL，则试剂四相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

3.若 ΔA 的值大于 0.4，则需减少样本加样体积 V1（如减至 10μL，则试剂四相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

天冬酰胺(Asn)含量(μmol/g 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] ÷ (W × V1 ÷ V) = 2 × $\Delta A \div W$

天冬酰胺(Asn)含量(μg/g 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] ÷ (W × V1 ÷ V) × Mr = 264.24 × $\Delta A \div W$

2、按细胞数量计算：

天冬酰胺(Asn)含量(nmol/10⁴ cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] ÷ (500 × V1 ÷ V) = 4 × ΔA

天冬酰胺(Asn)含量(ng/10⁴ cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] ÷ (500 × V1 ÷ V) × Mr = 528.5 × ΔA

3、按照液体体积计算：

天冬酰胺(Asn)含量(μmol/mL)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] ÷ V1 = 2 × ΔA

天冬酰胺(Asn)含量(μg/mL)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] ÷ V1 × Mr = 264.24 × ΔA

4、按照蛋白浓度计算：

天冬酰胺(Asn)含量(μmol/mg prot)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] ÷ (Cpr × V1 ÷ V) = 2 × $\Delta A \div Cpr$

天冬酰胺(Asn)含量(μg/mg prot)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] ÷ (Cpr × V1 ÷ V) × Mr = 264.24 × $\Delta A \div Cpr$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---样本加样体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积，7.4×10⁻⁴ L；

d---光径，1cm；

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；

W---样本质量，g；

500---细胞数量；万；

W---样本质量，g；

Mr---天冬酰胺分子量，132.12。

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。