

## 土壤天冬酰胺酶(S-ASNase)试剂盒说明书

(货号: BP10084W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

天冬酰胺酶 (ASNase, EC 3.5.1.1) 是酰胺酶的一种, 催化天冬酰胺水解成天冬氨酸和氨, 在氮素代谢中具有重要调控作用。

土壤中的天冬酰胺酶 (S-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。

### 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                                                                         |
|------|------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 40mL×1 瓶                  | 4℃保存   |                                                                              |
| 试剂二  | 粉剂 2 瓶                       | 4℃保存   | 每瓶:<br>1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 加入 11mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三  | 液体 60mL×1 瓶                  | 4℃保存   |                                                                              |
| 试剂四  | 液体 12mL×1 瓶                  | 4℃避光保存 |                                                                              |
| 试剂五  | 液体 6mL×1 瓶                   | 4℃保存   |                                                                              |
| 试剂六  | A: 液体 3.5mL×4 瓶<br>B: 液体 1 支 | 4℃保存   | 1. 临用前取 30 μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用;<br>2. 混匀后的试剂六一周内用完。                 |
|      |                              | 4℃避光保存 |                                                                              |
| 标准管  | 液体 2mL×1 支                   | 4℃保存   | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                |

### 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、甲苯、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、样本的制备：

取新鲜土样风干或者 37℃烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛网，备用。

【注】：土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

## 2、检测步骤：

① 培养：取 EP 管依次加入：

| 试剂组分 (μL)                                             | 测定管 | 对照管 |
|-------------------------------------------------------|-----|-----|
| 土样 (g)                                                | 0.1 | 0.1 |
| 甲苯                                                    | 20  | 20  |
| 振荡混匀，室温放置 15min                                       |     |     |
| 试剂一                                                   | 200 | 200 |
| 试剂二                                                   | 100 |     |
| 混匀，放入 37℃水浴锅或恒温培养箱中孵育 2h                              |     |     |
| 试剂三                                                   | 300 | 300 |
| 试剂二                                                   |     | 100 |
| 充分混匀，沸水浴 (95℃-100℃) 10min，室温 12000rpm 离心 10min，上清液待测。 |     |     |

② 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 630nm。

③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

| 试剂组分 (μL)                                                                                           | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                                 | 15  | 15  |
| 蒸馏水                                                                                                 | 45  | 45  |
| 试剂四                                                                                                 | 60  | 60  |
| 试剂五                                                                                                 | 30  | 30  |
| 试剂六                                                                                                 | 60  | 60  |
| 充分混匀，37℃放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A，<br>$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

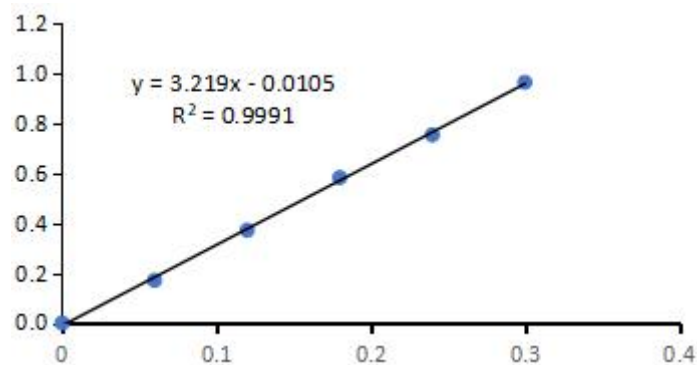
【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

2. 若  $\Delta A$  的值较小，可以增加 37℃孵育时间 T（如增至 4 小时或更长），或在显色反应阶段增加上清液的量 V1（如增至 30μL，则蒸馏水体积相应减少）；则改变后的反应时间 T 和上清液体积 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定的值大于 1.5，可以减少 37℃孵育时间 T（如减至 1 小时或更短），或在显色反应阶段减少上清液的量 V1（如减至 5μL，则蒸馏水体积相应增加）；则改变后的反应时间 T 和上清液体积 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程为  $y = 3.219x - 0.0105$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



2、单位定义：每克土样每小时催化天冬酰胺生成 1 $\mu$ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{S-ASNase } (\mu\text{g/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0105) \div 3.219 \times (V \div V_1) \div W \div T \\ &= 6.42 \times (\Delta A + 0.0105) \div W \end{aligned}$$

V---反应体系总体积，0.62mL；

V<sub>1</sub>---显色反应阶段上清液体积，0.015mL；

T---反应时间，2h；

W---土样质量；

附：标准曲线制作过程：

1 标准品母液浓度为 20 $\mu$ g/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 4, 8, 12, 16, 20  $\mu$ g/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

| 标品浓度<br>$\mu$ g/mL | 0   | 4   | 8   | 12  | 16  | 20  |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品稀释液<br>uL        | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL               | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。          |     |     |     |     |     |     |

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 ( $\mu$ L)                                                                                  | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                               | 15  |              |
| 蒸馏水                                                                                              |     | 60           |
| 试剂四                                                                                              | 60  | 60           |
| 试剂五                                                                                              | 30  | 30           |
| 试剂六                                                                                              | 60  | 60           |
| 充分混匀，37 $^{\circ}$ C放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。 |     |              |

