

天冬酰胺酶(Asparaginase, ASNase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: BP10375W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1, ASNase) 是一种酰胺水解酶, 能够将 L-天冬酰胺脱去氨基生成 L-天冬氨酸和氨。该酶具有抗肿瘤活性, 在食品和医药等领域应用十分广泛。

天冬酰胺酶 (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
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 22mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4℃ 保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每瓶再加 11mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 22mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 13mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂五	液体 7mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	A: 液体 3.5mL×4 瓶 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; 2. 混匀后的试剂六一周内用完。
		4℃ 避光保存	
标准管	液体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 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、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分足的样本可取 0.2-0.5g), 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】: 也可以按照组织质量 (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。

- ③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 630nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三		100
混匀，放入 37℃水浴锅或恒温培养箱中孵育 1h		
试剂二		100
试剂三	100	
混匀，室温 12000rpm 离心 10min，上清液待测。		

- ③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

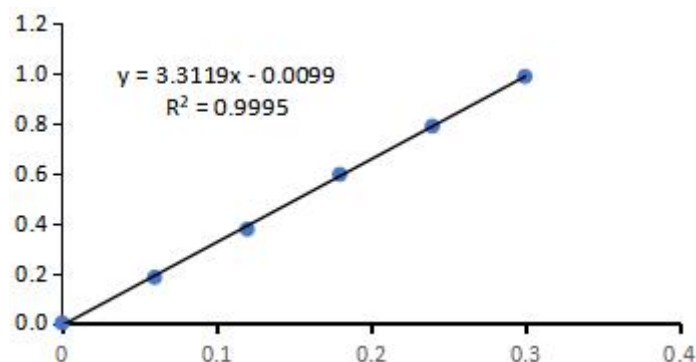
试剂组分（μL）	测定管	对照管
上清液（上步反应）	30	30
蒸馏水	30	30
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀，37℃放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

2. 若 ΔA 的值较小，可增加 37℃孵育时间（如增至 2 小时或更长），或在显色阶段增加上清液量 V_1 （如增至 60μL，则蒸馏水体积相应减少）；则改变后的 T 和 V_1 需代入计算公式重新计算。
3. 若 A 测定大于 1.5，可减少 37℃孵育时间（如减至 0.5 小时或更短），或在显色阶段减少上清液量 V_1 （如减至 15μL，则蒸馏水体积相应增加）；则改变后的 T 和 V_1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1. 标准曲线方程为 $y = 3.3119x - 0.0099$ ；x 为标准品质量（μg），y 为吸光值 ΔA 。



2. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白质每小时催化天冬酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0099) \div 3.3119 \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 85.6 \times (\Delta A + 0.0099) \div C_{\text{pr}}$$

3. 按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化天冬酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0099) \div 3.3119 \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T = 85.6 \times (\Delta A + 0.0099) \div W$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每小时催化天冬酰胺生成 $1\mu\text{g}$ 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0099) \div 3.3119 \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.171 \times (\Delta A + 0.0099)$$

5、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化天冬酰胺生成 $1\mu\text{g}$ 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h/mL}) = (\Delta A + 0.0099) \div 3.3119 \times (V_2 \div V_3) \div V_1 \div T = 85.6 \times (\Delta A + 0.0099)$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入②步反应体系中样本体积，0.04mL；

V2---②步反应体系总体积：0.34mL； V3---③步显色步骤中上清液体积，0.03mL；

T---反应时间，1h；

W---样本质量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液浓度为 $10\mu\text{g/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$ 。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 $\mu\text{g/mL}$	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 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 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	30	
蒸馏水	30	60
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀， 37°C 放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - 0 \text{ 浓度管}$ 。		