

天冬酰胺(L-Asparagine,Asn)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10376F 紫外法 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°C保存	
试剂一	液体 2 支	-20°C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°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	粉体 1 支	4°C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°C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°C保存	
试剂五	粉体 1 支	-20°C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°C保存	1. 标品浓度 1umol/mL, 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°C 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：

$$\text{天冬酰胺(Asn)含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) = 2 \times \Delta A \div W$$

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

2、按细胞数量计算：

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

$$\text{天冬酰胺(Asn)含量}(\text{ng}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr = 528.5 \times \Delta A$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{天冬酰胺(Asn)含量}(\mu\text{mol/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V1 = 2 \times \Delta A$$

$$\text{天冬酰胺(Asn)含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V1 \times Mr = 264.24 \times \Delta A$$

4、按照蛋白浓度计算：

$$\text{天冬酰胺(Asn)含量}(\mu\text{mol/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) = 2 \times \Delta A \div Cpr$$

$$\text{天冬酰胺(Asn)含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) \times Mr = 264.24 \times \Delta A \div Cpr$$

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， 6.22×10^3 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。