

天冬酰胺(L-Asparagine,Asn)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10376W 微板法 96 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 100mL×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 使液体落入管底 (可手动甩一甩); 2. 分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。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	每支:
试剂三	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. 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 15mL×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 1.1mL 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 1 支	4℃ 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)、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:

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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（ μL ）	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀，室温（25℃）条件下孵育 10min，于 340nm 处读取 A1。	
试剂五	10
混匀，室温（25℃）条件下孵育 15min，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40 μL ，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 10 μL ，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 10 μL ，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($\mu\text{mol/g}$ 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] $\div$ (W $\times V1 \div V$)=3.22 $\times \Delta A \div W$

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 $\times V1 \div V$) $\times Mr$ =425.4 $\times \Delta A \div W$

2、按细胞数量计算：

天冬酰胺(Asn)含量(nmol/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div$ (500 $\times V1 \div V$)=6.43 $\times \Delta A$

天冬酰胺(Asn)含量(ng/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div$ (500 $\times V1 \div V$) $\times Mr$ =849.5 $\times \Delta A$

3、按照液体体积计算：

天冬酰胺(Asn)含量($\mu\text{mol/mL}$)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] $\div V1$ =3.22 $\times \Delta A$

天冬酰胺(Asn)含量($\mu\text{g/mL}$)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] $\div V1 \times Mr$ =425.4 $\times \Delta A$

4、按照蛋白浓度计算：

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 $\times V1 \div V$)=3.22 $\times \Delta A \div Cpr$

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 $\times V1 \div V$) $\times Mr$ =425.4 $\times \Delta A \div Cpr$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---样本加样体积，0.02mL；

V2---反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ 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。