

## 天冬酰胺合成酶（Asparagine Synthetase, AS）试剂盒说明书

（货号：BP10084W-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

天冬酰胺合成酶（AS, EC 6.3.5.4）广泛存在于植物和微生物体内，是一个以氨或谷氨酰胺及天冬氨酸为底物催化合成天冬酰胺的关键酶，该酶对于研究植物营养有重要意义，

天冬酰胺合成酶（AS）催化谷氨酰胺的氨基转移到天冬氨酸形成天冬酰胺，同时生成谷氨酸；利用谷氨酸脱氢酶作用于生成的谷氨酸，同时使  $\text{NAD}^+$  还原成 NADH，通过测定 NADH 在 340nm 处的增加速率，进而得出天冬酰胺合成酶活性大小。

该酶催化反应： $\text{ATP} + \text{L-aspartate} + \text{L-glutamine} + \text{H}_2\text{O} = \text{AMP} + \text{diphosphate} + \text{L-asparagine} + \text{L-glutamate}$ 。

### 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  | 粉体 1 瓶       | 4℃ 保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 再加入 12mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 粉体 1 瓶       | -20℃ 保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 12mL 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  | 粉体 1 瓶       | 4℃ 保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 12mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。  |
| 试剂四  | 粉体 1 瓶       | 4℃ 保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 6mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。   |
| 试剂五  | 液体 50mL×1 瓶  | 4℃ 保存   |                                                                       |
| 试剂六  | 液体 4mL×1 瓶   | 4℃ 保存   |                                                                       |
| 试剂七  | 粉体 1 瓶       | -20℃ 保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用；<br>3. 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：

称取约 0.1g 组织（水分多的样本取 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】：若增加样本量，可按照组织质量（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。

## 2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分（μL）                                  | 测定管 | 对照管 |
|-------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                        | 100 | 100 |
| 试剂一                                       | 50  | 50  |
| 试剂二                                       | 50  | 50  |
| 试剂三                                       | 50  | 50  |
| 试剂四                                       | 50  |     |
| 试剂五                                       | 100 | 150 |
| 混匀，37℃下孵育 20 分钟                           |     |     |
| 95℃沸水浴 3 分钟，上下混匀后，12000rpm 离心 5 分钟，上清液待测。 |     |     |

③ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂组分（μL）                                                                                       | 测定管 | 对照管 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| ②步上清液                                                                                          | 80  | 80  |
| 试剂五                                                                                            | 90  | 90  |
| 试剂六                                                                                            | 20  | 20  |
| 试剂七                                                                                            | 10  | 10  |
| 混匀，37℃下孵育 30 分钟，于 340nm 处读吸光值 A，<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需设一个自身对照）。 |     |     |

【注】若  $\Delta A$  差值在零附近，可在③反应阶段增加上清液（V3）的量（如增加到 120-150μL，则试剂五相应减少）；或延长第②步中 37℃反应时间 T（如由 20min 增加至 40min）；或增加②步中样本加样体积 V1（如由 100μL 增至 200μL，则试剂五相应减少）；则改变后的 V3 或 T 或 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$AS(\text{nmol NADH}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_4 \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 160.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### 2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$AS(\text{nmol NADH}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_4 \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ = 160.8 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细胞数量计算：

单位定义：每  $10^4$  个细胞每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} AS(\text{nmol NADH/min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_4 \times 10^9] \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 160.8 \times \Delta A \div 500 \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL;

V1---②步中加入样本体积，0.1mL;

V2---②步反应体系总体积， $4 \times 10^{-4}$  L;

V3---③反应阶段中上清液， $0.8 \times 10^{-4}$  L;

V4---③步反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L;

d---96 孔板光径，0.5cm;

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm;

500---细胞数量，万;

W---样本质量，g;

T---反应时间，20min;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。