

天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, AS)活性测定

试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

天冬酰胺合成酶是广泛存在于生物体内的一类氨基转移酶,催化谷氨酰胺的氨基向天冬氨酸转移。当植物处于氨毒时天冬酰胺的形成是一种解毒反应。

测定原理:

AS 催化 L-天冬酰胺水解成 L-天冬氨酸和氨,利用奈氏试剂检测氨增加的速率,即可计算其酶活性。

需自备仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

试剂一:液体 60mL×1 瓶,4℃保存;

试剂二:粉剂×2 瓶,4℃避光保存;临用前每瓶加入 12.5mL 蒸馏水充分溶解待用,现配现用;

试剂三:液体 30 mL×1 瓶,常温保存;

试剂四:液体 10 mL×1 瓶,常温保存;

试剂五:液体 6 mL×1 瓶,常温保存;

试剂六:液体 6 mL×1 瓶,常温避光保存。

粗酶液提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞:先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;按照细菌或细胞数量(10^4 个):试剂一体积(mL)为 500~1000:1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一),超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 20%或 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次);8000g 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

组织:按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织,加入 1mL

试剂一),进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

2、血清(浆)样品:直接检测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 420nm，蒸馏水调零。

2、样品测定（在 EP 中加入下列试剂）：

试剂名称 (uL)	测定管	对照管
样本	25	
蒸馏水		25
试剂一	100	100
试剂二	400	400

混匀，37℃水浴 1 小时

试剂三	525	525
-----	-----	-----

混匀，8000 g，25℃离心 10 min；取上清液，在 EP 管中加入下列试剂

上清液	650	650
试剂四	150	150
试剂五	100	100
试剂六	100	100

混匀，室温静置 15min，420nm 处读取吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。对照管只要做一管

注意:

1、试剂六如出现沉淀，静置后取上清使用。

2、 ΔA ($A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$) 若出现负值，可能是酶活性较低，可将反应时间 1h 延长到 2h，相应的在计算公式中除以 2。

酶活性计算:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 3.8488x + 0.0057$ ， $R^2 = 0.9983$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为吸光值 A。

1、血清（浆）AS 活性

单位定义：每 mL 血清（浆）每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$AS (\text{nmol} / \text{min} / \text{mL}) = (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 181.8 \times (\Delta A - 0.0057)$$

2、组织、细菌或细胞 AS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 蛋白质每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$AS (\text{nmol} / \text{min} / \text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$AS (\text{nmol} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$$

$$= 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$AS (\text{nmol} / \text{min} / 10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$$

$$=0.3637 \times (\Delta A - 0.0057)$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 60min; V 反总: 反应体系总体积, 1.05mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.025mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万; 1000, μmol 到 nmol 换算系数。



Lifemall.asia

To be with you