

## 天冬酰胺(L-Asparagine,Asn)含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

### 一、产品简介：

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  $\text{NH}_4^+$ ，接着在谷氨酸脱氢酶作用下使  $\text{NH}_4^+$  和  $\alpha$ -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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×2 支	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使粉体落入底部，分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。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 mg×1 支	4°C 保存	使用前甩几下或离心使粉体落入底部，再分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C 保存	
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	液体 $\mu\text{L}$ ×1 支	-20°C 保存	使用前甩几下使液体落入底部，再加 1mL 蒸馏水混匀备用。
标准品	液体 mL×1 支	4°C 保存	此标准品不参与计算，仅用来验证试剂是否正常。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

### 四、天冬酰胺(Asn)含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

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、上机检测：

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°C)

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管(仅做一次)
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	140	140
混匀, 室温 (25°C) 条件下孵育 10min, 于 340nm 处读取 A1		
试剂五	10	10
混匀, 室温 (25°C) 条件下孵育 10min, 于 340nm 处读取 A2, $\Delta A = (A1 - A2)$ 测定 - $(A1 - A2)$ 空白。		

- 【注】1. 若 $\Delta A$ 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 $\Delta A$  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:

$$\begin{aligned} \text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 3.22 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times Mr \\ &= 425.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

### 2、按细胞数量计算:

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

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

### 3、按照液体体积计算:

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

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

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;

$\epsilon$ ---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。