

## 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,<br>$\Delta A = (A1 - A2)$ 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。