

土壤天冬酰胺酶(solid-asparaginase, S-ASNase) 测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-AJS015 分光法 48 样)

一、产品简介:

天冬酰胺酶 (ASNase, EC 3.5.1.1) 是酰胺酶的一种, 催化天冬酰胺水解成天冬氨酸和氨, 在氮素代谢中具有重要调控作用。

土壤中的天冬酰胺酶 (S-ASNase) 催化天冬酰胺水解成天冬氨酸和氨, 利用氨在强碱的环境下与次氯酸盐和苯酚作用, 生成水溶性染料靛酚蓝, 溶液颜色稳定。其在 630nm 处有特征吸收峰, 通过检测氨增加的速率, 即可计算该酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶 B: 液体 1 支	4°C保存	临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用。混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体 2mL×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该标曲。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅或恒温培养箱、甲苯和蒸馏水。

四、土壤天冬酰胺酶 (S-ASNase) 活性测定:

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、样本的制备:

取新鲜土样风干或者 37°C 烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛网备用。

【注】: 土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、上机检测:

① 培养: 取 EP 管依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土样 (g)	0.1	0.1
甲苯	20	20
振荡混匀, 室温放置 15min		
试剂一	200	200
试剂二	100	
混匀, 放入 37°C 水浴锅或恒温培养箱中孵育 2h		
试剂三	300	300
试剂二		100
充分混匀, 沸水浴 (95°C-100°C) 10min, 室温 12000rpm 离心 10min,		

上清液待测。

- ② 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 630nm，蒸馏水调零。
③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	60	60
蒸馏水	180	180
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240

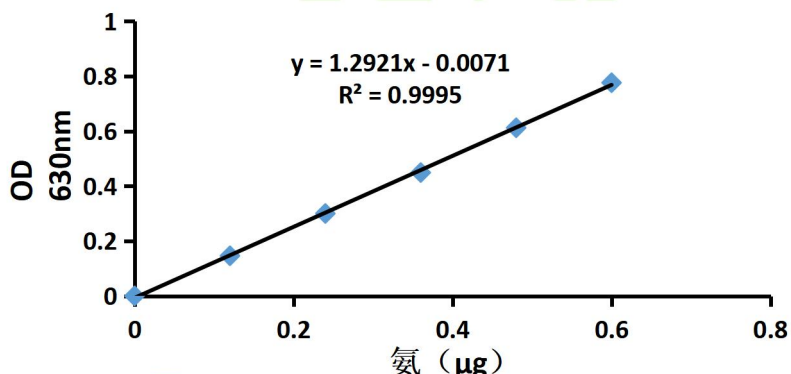
充分混匀，37°C 放置 20min 后，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。

【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

2. 若 ΔA 的值较小，可以增加 37°C 孵育时间 T (如增至 4 小时或更长)，或在显色反应阶段增加上清液的量 V1 (如增至 120μL，则蒸馏水体积相应减少)；则改变后的反应时间 T 和上清液体积 V1 需代入计算公式重新计算。
3. 若 A 测定的值大于 1.8，可以减少 37°C 孵育时间 T (如减至 1 小时或更短)，或在显色反应阶段减少上清液的量 V1 (如减至 30μL，则蒸馏水体积相应增加)；则改变后的反应时间 T 和上清液体积 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程为 $y = 1.2921x - 0.0071$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为吸光值 ΔA 。



- 2、单位定义：每克土样每小时催化天冬酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$S\text{-ASNase}(\mu\text{g/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V \div V1) \div W \div T \\ = 4 \times (\Delta A + 0.0071) \div W$$

V---反应体系总体积，0.62mL；

V1---显色反应阶段上清液体积，0.06mL；

T---反应时间，2h；

W---土样质量；

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液 (10μg/mL 的氨) ；
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 2, 4, 6, 8, 10 μg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照显色反应阶段的测定管加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。