

天冬酰胺(L-Asparagine,Asn)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-AJS019-96 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 NH_4^+ , 接着在谷氨酸脱氢酶作用下使 NH_4^+ 和 α -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	液体 2 支	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使液体落入底部, 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 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 1 支	-20°C 保存	
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	粉体 1 支	-20°C 保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1mL 蒸馏水混匀备用。
标准品	液体 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
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀, 室温 (25℃) 条件下孵育 10min, 于 340nm 处读取 A1。	
试剂五	10
混匀, 室温 (25℃) 条件下孵育 15min, 于 340nm 处读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 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 ΔA 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:

天冬酰胺(Asn)含量(μmol/g 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] $\div$ (W $\times V1 \div V$)=3.22 $\times \Delta A \div W$

天冬酰胺(Asn)含量(μg/g 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6$] $\div$ (W $\times V1 \div V$) $\times Mr$ =425.4 $\times \Delta A \div W$

2、按细胞数量计算:

天冬酰胺(Asn)含量(nmol/10⁴ cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div$ (500 $\times V1 \div V$)=6.43 $\times \Delta A$

天冬酰胺(Asn)含量(ng/10⁴ cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div$ (500 $\times V1 \div V$) $\times Mr$ =849.5 $\times \Delta A$

3、按照液体体积计算:

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

天冬酰胺(Asn)含量(μg/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;

V2---反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$ L;

ϵ ---NADH 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;

V1---样本加样体积, 0.02mL;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

W---样本质量, g;

Mr---天冬酰胺分子量, 132.12。