

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 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4℃保存	每瓶: 1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶 B: 液体 1 支	4℃保存	1. 临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用; 2. 混匀后的试剂六一周内用完。
		4℃避光保存	
标准管	液体 2mL×1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、甲苯、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本的制备:

取新鲜土样风干或者 37℃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、检测步骤:

① 培养: 取 EP 管依次加入:

试剂组分 (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：

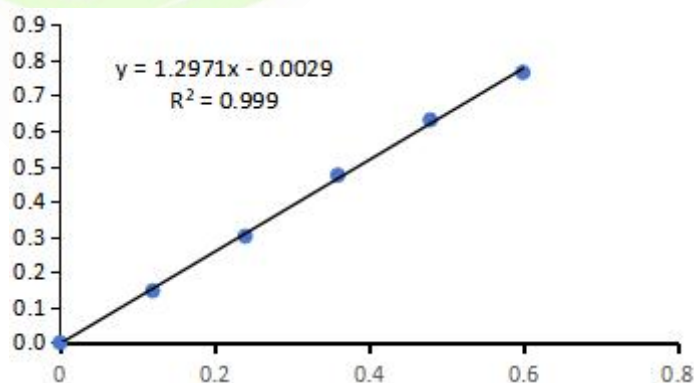
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
上清液	60	60
蒸馏水	180	180
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240
充分混匀，37°C 放置 20min 后，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

- 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。
- 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 $y = 1.2971x - 0.0029$ ；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。

$$\begin{aligned} \text{S-ASNase}(\mu\text{g/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0029) \div 1.2971 \times (V \div V1) \div W \div T \\ &= 4 \times (\Delta A + 0.0029) \div W \end{aligned}$$

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 标准品母液浓度为 10 μ g/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 2, 4, 6, 8, 10 μ g/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 μ g/mL	0	2	4	6	8	10
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	60	
蒸馏水	180	240
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240
充分混匀，37 $^{\circ}$ 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， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		