Asparagine Synthetase Assay Kit

天冬酰胺合成酶（AS）试剂盒说明书

货号：G0439W48 |方法：微板法| 规格：48 样

一、产品简介：

天冬酰胺合成酶（AS，EC 6.3.5.4) 广泛存在于植物和微生物体内，是一个以氨或谷氨酰胺及天冬氨酸为底物催化合成天冬酰胺的关键酶，该酶对于研究植物营养有重要意义，

天冬酰胺合成酶（AS) 催化谷氨酰胺的氨基转移到天冬氨酸形成天冬酰胺，同时生成谷氨酸；利用谷氨酸脱氢酶作用于生成的谷氨酸，同时使 NAD^+还原成 NADH，通过测定 NADH 在 340nm 处的增加速率，进而得出天冬酰胺合成酶活性大小。

该酶催化反应：ATP+L-aspartate+L-glutamine+H_2O=AMP+diphosphate+L-asparagine+L-glutamate。

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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 瓶	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、天冬酰胺合成酶（AS）活性检测：

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：

称取约 0.1g 组织（水分多的样本取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取。

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℃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。

2、上机检测：

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	50	50
试剂二	50	50
试剂三	50	50
试剂四	50	
试剂五	100	150
混匀，37℃下孵育 20 分钟		
95℃沸水浴 3 分钟，上下混匀后，12000rpm 离心 5 分钟，上清液待测。		

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
②步上清液	80	80
试剂五	90	90
试剂六	20	20
试剂七	10	10
混匀，37℃下孵育 30 分钟，于 340nm 处读吸光值 A，△A=A 测定-A 对照（每个样本需设一个自身对照 ）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmoL 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$AS(nmol\ NADH/min/mg\ prot)=[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V4\times10^{9}]\times(V2\div V3)\div(V1\times Cpr)\div T$

$=160.8\times\Delta A\div Cpr$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟生成 1nmoL 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$AS(nmol\ NADH/min/g\ 鲜重)=[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V4\times10^{9}]\times(V2\div V3)\div(W\times V1\div V)\div T$

$=160.8\times\Delta A\div W$

3、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟生成 1nmoL 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$AS(nmol\ NADH/min/10^4\ cell)=[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V4\times10^{9}]\times(V2\div V3)\div(500\times V1\div V)\div T$

$=160.8\times\Delta A\div500$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---②步中加入样本体积，0.1mL；

V2---②步反应体系总体积，4×10^{-4} L；

V3---③反应阶段中上清液，0.8×10^{-4} L；

V4---③步反应体系总体积，2×10^{-4} L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

ε---NADPH 摩尔消光系数，6.22×10^{3} L/moL/cm；

500---细胞数量，万；

W---样本质量，g；

T---反应时间，20min；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。