

## 天冬酰胺酶(Asparaginase, ASNase)活性测定试剂盒

分光法 48 样

### 产品简介:

天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1, ASNase) 是一种酰胺水解酶, 能够将 L-天冬酰胺脱去氨基生成 L-天冬氨酸和氨。该酶具有抗肿瘤活性, 在食品和医药等领域应用十分广泛。

天冬酰胺酶 (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。

### 试剂盒组成和配制:

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	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 11mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶	4℃保存	临用前取 60μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀

	B: 液体 $\mu\text{L}\times 1$ 支		后作为试剂六使用。混匀后的试剂六一周内用完。
标准品	液体 $\text{mL}\times 1$ 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

### 所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、常温离心机、移液器、蒸馏水、振荡仪。

### 天冬酰胺酶 (ASNase) 活性测定:

#### 1、样本制备:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织 (水分足的样本可取 0.2-0.5g), 加入 1mL 提取液; 进行冰浴匀浆。

12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

**[注]:** 也可以按照组织质量 (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°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。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

① 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 630nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在 EP 管依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	200	200
试剂二	200	
试剂三		200
混匀，放入 37°C 水浴锅或恒温培养箱中孵育 1h。		
试剂二		200
试剂三	200	
混匀，室温 12000rpm 离心 10min，上清液待测。		

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（上步反应）	60	60
蒸馏水	80	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。

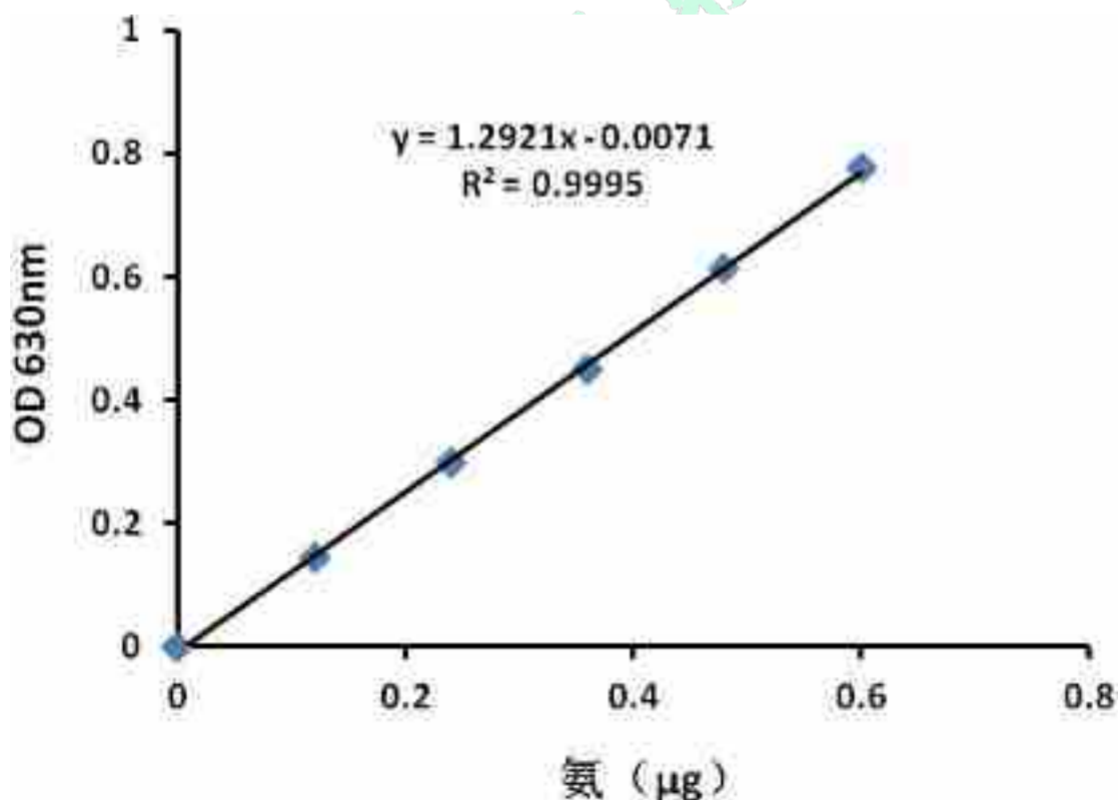
2. 若 $\Delta A$  的值较小,可增加 37°C 孵育时间 (如增至 2 小时或更长),或在显色阶段增加上清液量 V1(如增至 120 $\mu$ L, 则蒸馏水体积相应减少);则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定大于 1.8,可减少 37°C 孵育时间 (如减至 0.5 小时或更短),或在显色阶段减少上清液量 V1(如减至 30 $\mu$ L, 则蒸馏水体积相应增加);则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

### 结果计算:

#### 1、标准曲线方程:

$y = 1.2921x - 0.0071$ ; x 为标准品质量 ( $\mu$ g), y 为吸光值 $\Delta A$ 。



#### 2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白质每小时催化天冬酰胺生成 1 $\mu$ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div \text{Cpr}$$

### 3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化天冬酰胺生成 1 $\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div W$$

### 4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10<sup>4</sup>个细胞每小时催化天冬酰胺生成 1 $\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h}/10^4\text{cell}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.22 \times (\Delta A + 0.0071) \div W$$

### 5、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化天冬酰胺生成 1 $\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase}(\mu\text{g/h/mL}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div V1 \div T = 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div W$$

V---提取液体积，1mL； V1----加入②步反应体系中样本体积，0.08mL；

V2---②步反应体系总体积：0.68mL； V3---③步显色步骤中上清液体积，0.06mL；

T---反应时间，1h； W---样本质量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

### 附：标准曲线制作过程：

1. 标准品母液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的氨)，把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
2. 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。