

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

### ( 分 光 法 4 8 样 )

#### 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。

#### 试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×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 60mL×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	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。
	B: 液体 μL×1 支		

标准品	液体 mL×1 支	4℃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)、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。

## 土壤天冬酰胺酶(S-ASNase)活性测定:

### 1、样本制备:

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、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℃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℃-100℃) 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）。

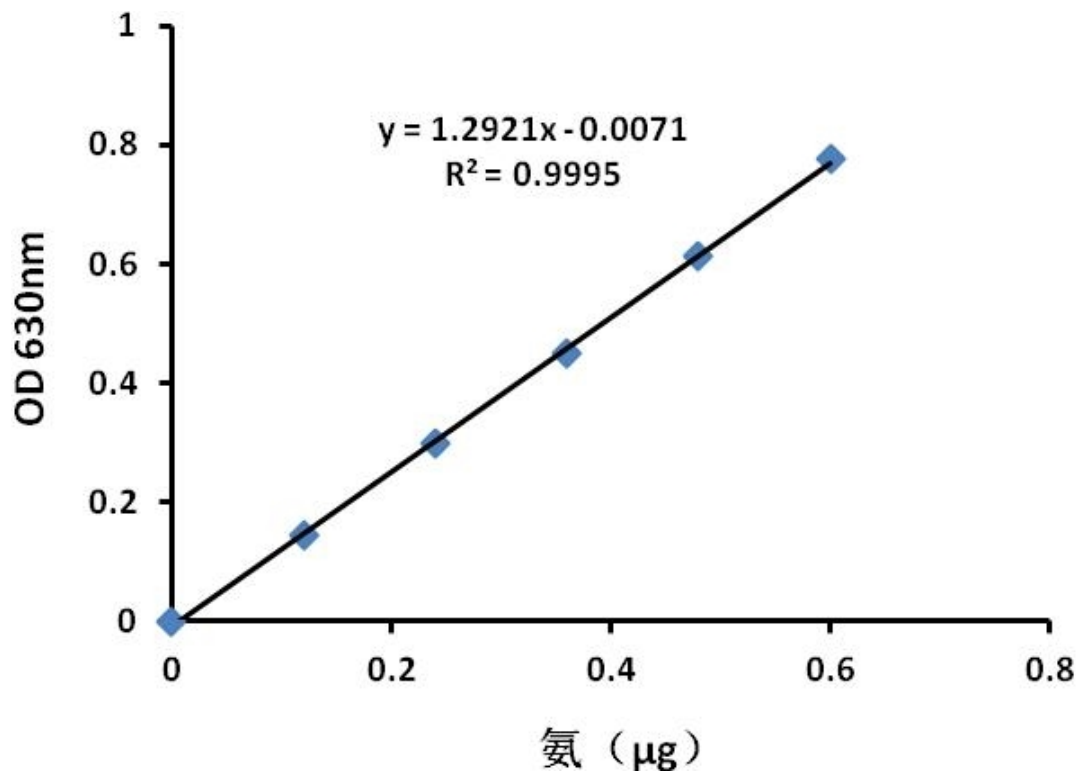
**[注]:** 1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

2. 若 $\Delta A$  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。

## 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 $\Delta A$ 。



**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。

