

天冬酰胺酶(ASNase/asparaginase)活性测定试剂盒

(微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 20mL×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 11mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	A: 液体 3.5mL×4 瓶 B: 液体μL×1 支	4°C保存	临用前取 30μL 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

			六周内用完。
标准品	液体×1支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该标曲

所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、台式离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

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℃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℃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 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 630nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管依次加入：

试剂 (μL)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三		100
混匀，放入 37°C 水浴锅或恒温培养箱中孵育 1h		
试剂二		100
试剂三	100	
混匀，室温 12000rpm 离心 10min，上清液待测。		

③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

试剂 (μL)	测定管	对照管
上清液（上步反应）	30	30
蒸馏水	30	30
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀，37°C 放置 20min 后，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。

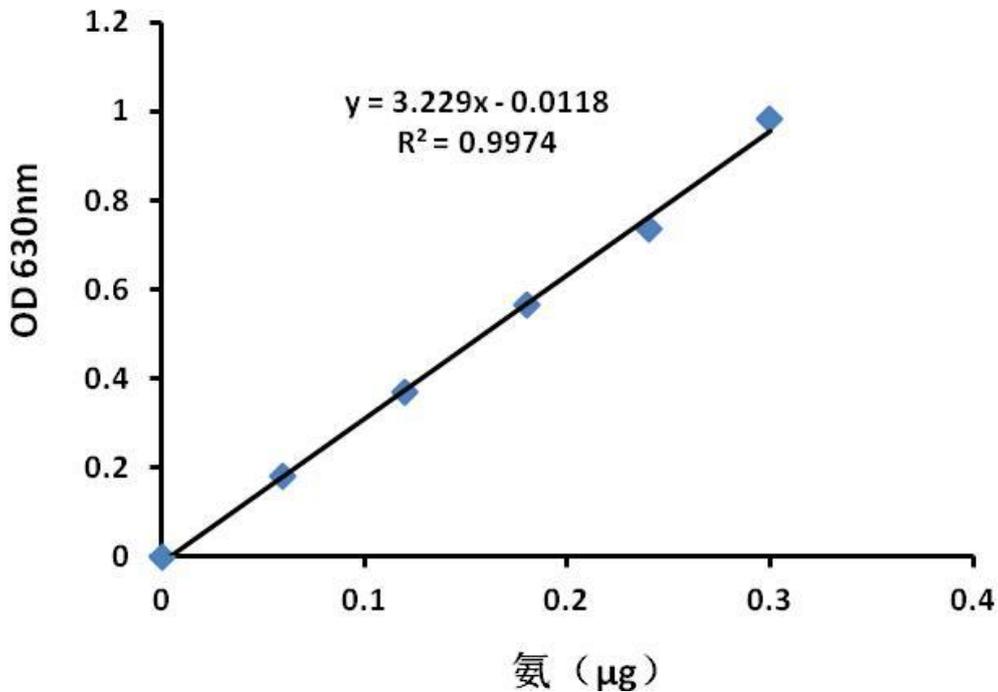
2. 若 ΔA 的值较小，可增加 37°C 孵育时间（如增至 2 小时或更长），或在显色阶段增加上清液量 V1（如增至 60μL，则蒸馏水体积相应减少）；则改变后的 T 和 V1 需代入计算公

式重新计算。

3. 若 A 测定大于 1.5, 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 15 μ 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: $y = 3.229x - 0.0118$; x 为标准品质量 (μ g), y 为吸光值 ΔA 。



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 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 87.75 \times (\Delta A + 0.0118) \div \text{Cpr}$$

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 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 87.75 \times (\Delta A + 0.0118) \div W$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 个细胞每小时催化天冬酰胺生成 1 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.18 \times (\Delta A + 0.0118) \div W$$

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 μ g 氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{ASNase } (\mu\text{g/h/mL}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div V1 \div T = 87.75 \times (\Delta A + 0.0118) \div W$$

V---提取液体积，1mL； V1----加入②步反应体系中样本体积，0.04mL；

V2---②步反应体系总体积：0.34mL； V3---③步显色步骤中上清液体积，0.03mL；

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 μ g/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 μ g/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。