

天冬酰胺(L-Asparagine,Asn)含量测定试剂盒说明书

(紫外分光法 48 样)

一、产品简介：

天冬酰胺 (Asn) 是 20 种天然氨基酸之一，被所有生物用于蛋白质合成。在人类中是一种非必需氨基酸，因为它可以在体内由天冬氨酸和谷氨酰胺合成。

本试剂盒利用天冬酰胺酶使天冬酰胺分解成天冬氨酸和 NH_4^+ ，接着在谷氨酸脱氢酶作用下使 NH_4^+ 和 α -酮戊二酸反应，同时使 NADH 氧化，通过检测 NADH 在特异吸收波长 340nm 处的下降量，进而计算出天冬酰胺 (Asn) 的含量。

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×2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部，分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃保存	用前甩几下或离心使粉体落入底部，再分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	
试剂四	液体 30mL×1 支	4℃保存	
试剂五	液体 μL ×1 支	-20℃保存	用前甩几下使液体落入底部，再加 1mL 蒸馏水混匀备用。
标准品	液体 1mL×1 支	4℃保存	此标准品不参与计算，仅用来验证试剂是否正常。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、天冬酰胺(Asn)含量测定：

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：0.1g 组织样本（水分充足的样本建议取 0.5g 左右），加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，离心 10min，上清液待测。

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 液体样品：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则 12000rpm，离心 10min 取上清液待测。

2、上机检测：

① 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管(仅做一次)
------------------------	-----	-----------

样本	60	
蒸馏水		60
试剂一	20	20
试剂二	20	20
试剂三	20	20
试剂四	600	600
混匀，室温（25℃）条件下孵育 10min，于 340nm 处读取 A1		
试剂五	20	20
混匀，室温（25℃）条件下孵育 10min，于 340nm 处读取 A2， $\Delta A = (A1 - A2)$ 测定 - $(A1 - A2)$ 空白。		

- 【注】1.若 ΔA 值在零附近，可增加样本取样质量W或增加样本加样体积V1（如增至40 μ L，则试剂四相应减少），则改变后的W和V1需代入计算公式重新计算。
- 2.若起始值 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样体积 V1（如减至 10 μ L，则试剂四相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。
- 3.若 ΔA 的值大于 0.4，则需减少样本加样体积 V1（如减至 10 μ L，则试剂四相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\mu\text{mol/g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 2 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times Mr \\ &= 264.24 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \\ &= 4 \times \Delta A \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\text{ng}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \\ &= 528.5 \times \Delta A \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V1 = 2 \times \Delta A$$

$$\text{天冬酰胺 (Asn) 含量}(\mu\text{g}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div V1 \times Mr = 264.24 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---样本加样体积，0.06mL；

V2---反应体系总体积，7.4 $\times 10^{-4}$ L；

d---光径，1cm；

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ L/mol/cm；

W---样本质量，g；

500---细胞数量；万； W---样本质量，g；

Mr---天冬酰胺分子量，132.12。