

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

(货号: G0346W 微板法 96 样)

一、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。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃ 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 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	A: 液体 3.5mL×4 瓶 B: 液体 μL×1 支	4℃ 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。混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体 mL×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲,则用到该标曲。

三、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、水浴锅或恒温培养箱、甲苯和蒸馏水。

四、土壤天冬酰胺酶(S-ASNase)活性测定:

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、样本的制备:

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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 630nm。

③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	15	15
蒸馏水	45	45
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀，37℃放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A， ΔA=A 测定管-A 对照管（每个样本做一个自身对照）。		

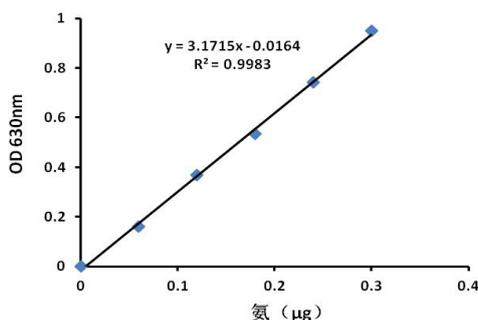
【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

2. 若 ΔA 的值较小，可以增加 37℃ 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 30μL，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 1.5，可以减少 37℃ 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 5μL，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。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 3.1715x - 0.0164$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为吸光值 ΔA。



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。

$$S\text{-ASNase } (\mu\text{g/h/g 土样}) = (\Delta A + 0.0164) \div 3.1715 \times (V \div V1) \div W \div T \\ = 6.52 \times (\Delta A + 0.0164) \div W$$

V---反应体系总体积，0.62mL；

V1---显色反应阶段上清液体积，0.015mL；

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 (20μg/mL 的氨)：

2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 4, 8, 12, 16, 20 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。