天净沙系列

CAT#:7-C70-47-3

低温运输和保存

天净沙

L-天冬酰胺含量测定试剂盒

Asn Assay Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定天冬酰胺（L-Asparagine，Asn，CAS 70-47-3）含量。其原理是Asn 和特异反应物在酶作用下反应生成在 340 nm 处有特征光吸收的物质。以其为测定物，通过检测其吸光度在此波长下的改变即可计算出待测样本中 Asn 含量。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 提供 Asn 标准品，便于在遇到问题时分析原因。
3. 适用于检测从各种样本中提取的，或合成的 Asn。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品采用小扁盒包装

成份	编号	规格	包装
Asn 提取液	7-C70-47-3a	60 mL×2	60 mL 本色瓶
Asn 测定液一	7-C70-47-3b	50 T×4	1.5 mL 棕色管
Asn 测定干粉二	7-C70-47-3c	50 T×2	1.5 mL 本色管
Asn 测定干粉三	7-C70-47-3d	50 T×2	1.5 mL 本色管
Asn 测定液四	7-C70-47-3e	32 mL×2	60 mL 本色瓶
Asn 测定干粉五	7-C70-47-3f	50 T×2	1.5 mL 本色管
Asn 标准品	7-C70-47-3g	1 mL×2	1.5 mL 本色管
使用手册	7-C70-47-3sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，Asn 测定液一、Asn 测定干粉三和 Asn 测定干粉五是-20℃保存，其他 4℃保存；有效期 3 个月。

自备试剂

待测样品，蒸馏水（去离子水、超纯水均可），比色皿及与之匹配的分光光度计等。

使用方法

一、试剂的准备和配制

1. Asn 测定液一：临用前 8000×g 4℃ 离心 2 mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）；分别加 0.55 mL 蒸馏水溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃避光保存，禁止反复冻融，三天内用完。
2. Asn 测定液二和 Asn 测定液三：Asn 测定干粉二和 Asn 测定干粉三开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；分别加 1.1 mL 蒸馏水溶解备用；即分别得 Asn 测定液二（4℃保存）和 Asn 测定液三（-20℃保存）；保存周期与试剂盒有效期相同。
3. Asn 测定液五：Asn 测定干粉五开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；加入 1 mL 蒸馏水混匀备用；-20℃保存，保存周期与试剂盒有效期相同。

4. Asn标准品：标品浓度1 μmol/mL，此标准品不参与计算，仅用来验证试剂是否正常；保存周期（4℃保存）与试剂盒有效期相同。

二、样本提取：建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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

6. 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1 mL Asn提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率200 W，超声3 s，间隔10 s，重复30 次）；12000×g 4℃离心10 min，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。本实验亦可用裂解液裂解细胞样本进行后续实验检测，裂解方式以裂解液操作说明为准。

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

三、检测步骤:

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

9. 所有试剂解冻至室温（25℃）

10. 在1 mL石英比色皿（光径1 cm）中依次加入：

试剂组分	测定管（μL）
样本	60
Asn测定液一	20
Asn测定液二	20
Asn测定液三	20
Asn测定液四	600
混匀，室温（25℃）条件下孵育10 min，于340 nm处读取A1。	
Asn测定液五	20
混匀，室温（25℃）条件下孵育10 min，于340 nm处读取A2，△A = A1 - A2。	

注：若△A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（如增加40 μL，则Asn测定液四相应减少），则改变后的W和V1需代入计算公式重新计算；

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（如减少 10 μL，则 Asn 测定液四相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算；

若ΔA 的值大于 0.4，则需减少样本加样体积 V1（如减少 10 μL，则 Asn 测定液四相应增加），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。

四、结果计算

按照样本质量计算：

11. 天冬酰胺（Asn）含量 (μmol/g 鲜重) = [ΔA×V2 ÷ (ε×d) ×10^6 ÷ (W×V1÷V) = 2×ΔA÷W
12. 天冬酰胺（Asn）含量 (μg/g 鲜重) = [ΔA×V2 ÷ (ε×d) ×10^6] ÷ (W×V1÷V) ×Mr = 264.24×ΔA÷W

按细胞数量计算：

13. 天冬酰胺（Asn）含量 (nmol/10^4 cell) = [ΔA×V2÷ (ε×d) ×10^9] ÷ (500×V1÷V) = 4×ΔA
14. 天冬酰胺（Asn）含量 (ng/10^4 cell) = [ΔA×V2÷ (ε×d) ×10^9] ÷ (500×V1÷V) ×Mr = 528.5×ΔA

按照液体体积计算：

15. 天冬酰胺（Asn）含量 (μmol /mL) = [ΔA×V2÷ (ε×d) ×10^6] ÷V1 = 2×ΔA
16. 天冬酰胺（Asn）含量 (μg/mL) = [ΔA×V2÷ (ε×d) ×10^6] ÷V1×Mr = 264.24×ΔA

按照蛋白浓度计算：

17. 天冬酰胺（Asn）含量 (μmol/mg prot) = [ΔA×V2÷ (ε×d) ×10^6] ÷ (Cpr×V1÷V) = 2×ΔA÷Cpr
18. 天冬酰胺（Asn）含量 (μg/mg prot) = [ΔA×V2÷ (ε×d) ×10^6] ÷ (Cpr×V1÷V) ×Mr = 264.24×ΔA÷Cpr。

注：V---加入提取液体积，1 mL； V1---样本加样体积，0.06 mL；V2---反应体系总体积，0.74 mL； d---光径，1 cm；ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；W---样本质量，g ；500---细胞数量，万； Mr---天冬酰胺分子量，132.12； Cpr---蛋白浓度（mg/mL）。

关联产品	尿苷-5-二磷酸