



乙酰乳酸合成酶（ALS）活性试剂盒

可见分光光度法

货号: R43918-24S

产品简介:

乙酰乳酸合成酶(ALS,EC 2.2.1.6) 是支链氨基酸生物合成途径中的一个关键酶,此生物合成过程只存在于植物和微生物体内, 是绿色除草剂的重要作用靶标。

乙酰乳酸合成酶(ALS) 可催化2分子的丙酮酸生成乙酰乳酸, 该产物在硫酸作用下脱羧生成乙酰甲基甲醇, 该产物与显色剂反应生成有色物质, 该有色物质在525nm 处有特征吸收峰, 通过检测该有色物质的增加速率即可得出ALS 酶活性大小。

反应方程式: $2 \text{ pyruvate } = 2\text{-acetolactate} + \text{CO}_2$ 。

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×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加1.2mL蒸馏水混匀溶解, 仍4℃保存。
试剂二	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	液体2mL×1支	4℃保存	
试剂四	液体10mL×1瓶	4℃保存	
试剂五	液体10mL×1瓶	4℃保存	
标准品	粉体×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)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、蒸馏水。



乙酰乳酸合成酶 (ALS) 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、样本制备:

①组织样本: 取约0.2g 组织(水分充足的样本可取0.5g), 加入1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4℃×12000rpm 离心15min, 取上清液待测。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (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。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30 min, 调节波长为525nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂于25℃水浴中预热10 min。

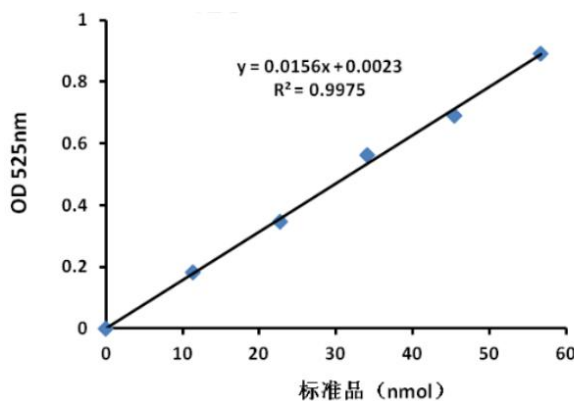
③在EP管中依次加入下列试剂:

试剂名称(μL)	样本管	对照管
试剂一	40	
试剂二	260	300
样本	100	100
35℃条件下, 暗反应1h		
试剂三	40	40
收 60℃条件下水浴脱羧15min		
试剂四	200	200
试剂五	200	200
60℃下水浴显色15min, 12000rpm离心5min, 取澄清上清液至1mL玻璃比色皿(光径1cm), 于525nm处读值。△A=A测定-A对照(每个样本做一个自身对照)。		



结果计算:

1、标准曲线: $y=0.0156x+0.0023$; x 是标准品乙酰甲基甲醇摩尔质量 (nmol); y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 每克组织每小时催化底物产生 1nmol 乙酰甲基甲醇定义为一个酶活单位。

$$\text{ALS}(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0023) \div 0.0156] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$
$$= 641 \times (\Delta A - 0.0023) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克蛋白每小时催化底物产生 1nmol 乙酰甲基甲醇定义为一个酶活单位。

$$\text{ALS}(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0023) \div 0.0156] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$
$$= 641 \times (\Delta A - 0.0023) \div Cpr \times D$$

4、按细菌数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每小时催化底物产生 1nmol 乙酰甲基甲醇定义为一个酶活单位。

$$\text{ALS}(\text{nmol/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A - 0.0023) \div 0.0156] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$
$$= 1.28 \times (\Delta A - 0.0023) \times D$$

W---样品质量, g;

V-- 提取液体积, 1mL;



V1--- 上清液体积 (mL), 0.1mL;

T--- 反应时间, 1h。

D---稀释倍数, 未稀释即为1;

50---细胞数量, 万;

Cpr----上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1.制备标准品母液(1mg/mL): 向标准品EP管里面加入1mL 蒸馏水混匀溶解。
- 2.把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3.依据对照管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线, 标准品乙酰甲基甲醇的摩尔质量为88.11。