

乙酰乳酸合成酶(ALS)活性试剂盒

微板法 48 样

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 | 粉体 mg×1 支 | 4°C 保存 | 临用前用几下使粉体落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水混匀溶解, 仍 4°C 保存。 |
| 试剂二 | 液体 15mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂三 | 液体 2mL×1 支 | 4°C 保存 | |
| 试剂四 | 液体 10mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂五 | 液体 10mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 标准品 | 粉体×1 支 | 4°C 保存 | 若重新做标曲, 则用到该试剂 |

所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、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°C×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°C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 (10⁴)：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长为 525nm。

② 所有试剂于 25°C水浴中预热 10 min。

③ 在 EP 管中依次加入下列试剂：

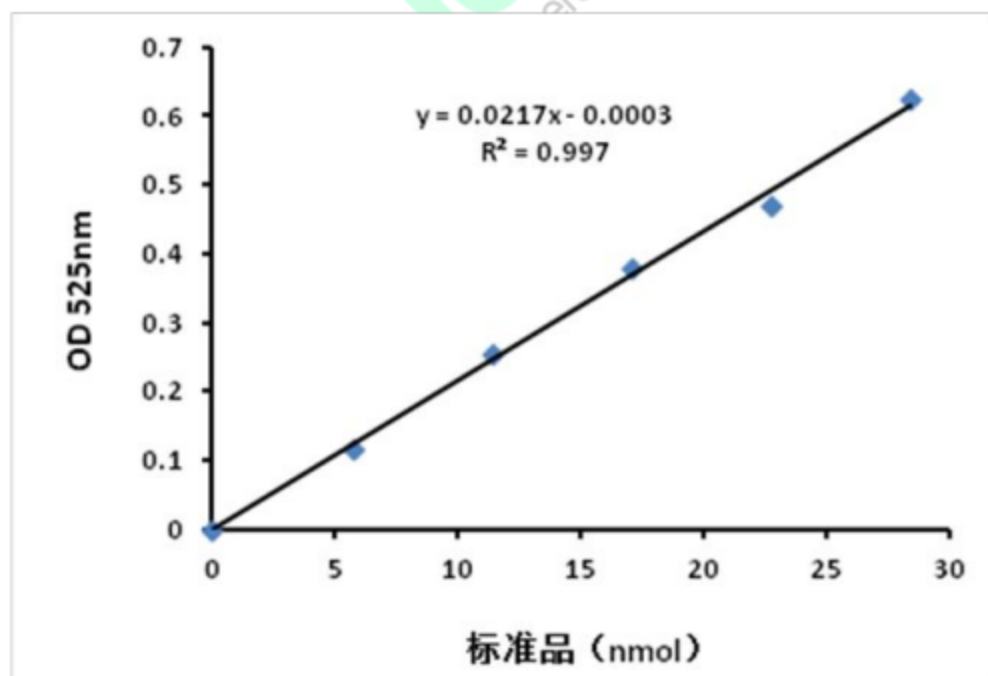
| 试剂名称（ μL ） | 样本管 | 对照管 |
|-----------------------|-----|-----|
| 试剂一 | 20 | |
| 试剂二 | 130 | 150 |
| 样本 | 50 | 50 |
| 35°C条件下，暗反应 1h | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 试剂三 | 20 | 20 |
| 60℃条件下水浴脱羧 15 min | | |
| 试剂四 | 100 | 100 |
| 试剂五 | 100 | 10 |
| 60℃条件下水浴显色 15 min，12000rpm 离心 5min，取 200μL 澄清液体至 96 孔板中，于 525nm 处读值。ΔA=A 测定 -A 对照（每个样本做一个自身对照）。 | | |

[注]: 若ΔA 的值非常低在零附近,可增加样本量 V1 (如增至 100μL, 则试剂二相应减少) 或延长反应时间 T (如增至 2h 或更长), 则重新调整的 V1 和 T 代入公式重新计算。

结果计算:

1、标准曲线: $y = 0.0217x - 0.0003$, 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。

$$\text{ALS (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0217] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 921.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div W \times D$$

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。

$$\text{ALS (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0217] \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \times D = 921.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div \text{Cpr} \times D$$

4、按细菌数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 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。

$$\text{ALS (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0217] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 1.84 \times (\Delta A + 0.0003) \times D$$

W---样品质量, g; V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.05mL; T---反应时间, 1h。

D---稀释倍数, 未稀释即为 1; 500---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, 0.05 mg/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。