

乙酰乳酸合成酶(Acetolactate synthase, ALS)活性测定试剂盒

分光法 24 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 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：

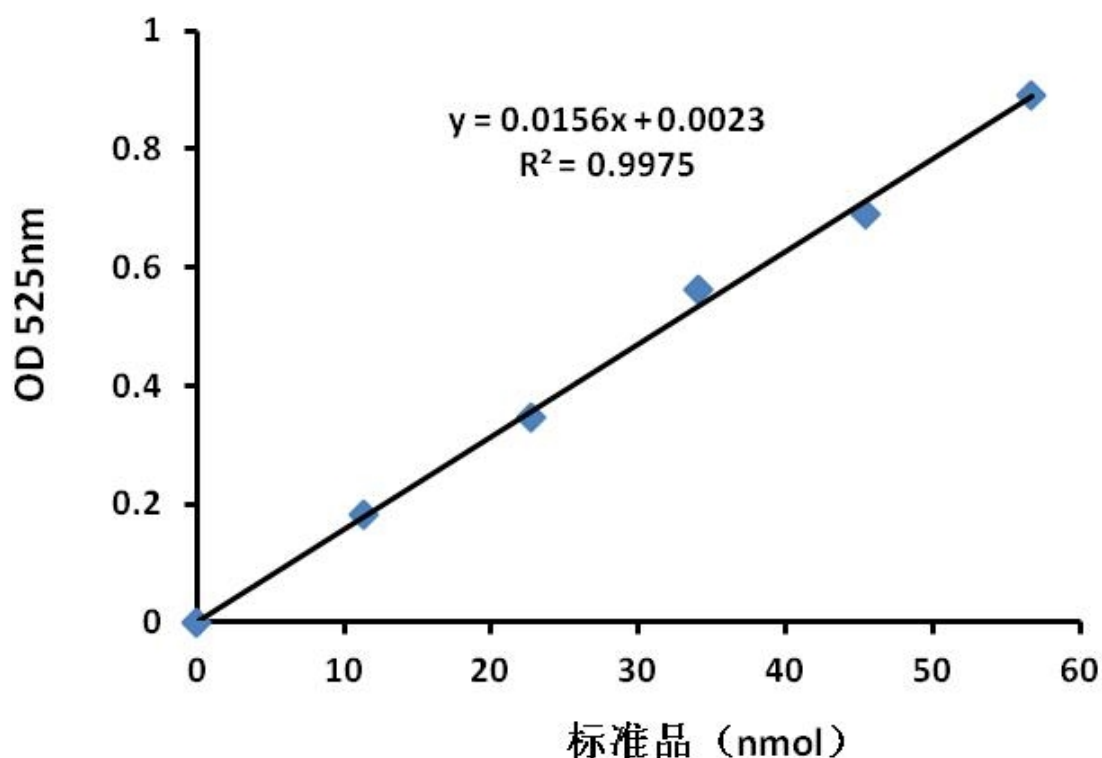
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
-----------------------	-----	-----

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
60℃条件下水浴脱羧 15min。		
试剂四	200	200
试剂五	200	200

[注]：若ΔA 的值非常低在零附近,可增加样本量 V1（如增至 200μL, 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。

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。

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

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。

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

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。

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

$\times D$

W---样品质量, g; V---提取液体积, 1 mL;

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; 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。