

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

(微板法 48 样)

一、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: $2 \text{ pyruvate} = 2\text{-acetolactate} + \text{CO}_2$ 。

二、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 100mL×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

三、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。

四、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 酶标仪预热 30 min, 调节波长为 525nm。

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:

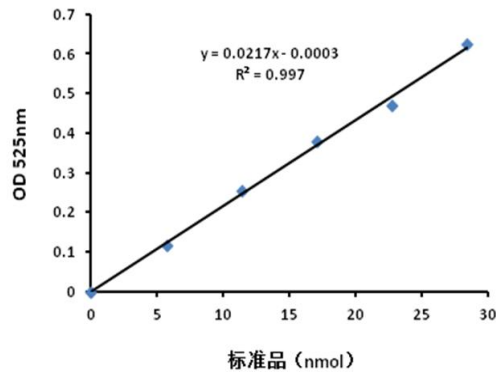
试剂名称 (μL)	样本管	对照管
试剂一	20	
试剂二	130	150

样本	50	50
35°C条件下, 暗反应 1h		
试剂三	20	20
60°C条件下水浴脱羧 15min		
试剂四	100	100
试剂五	100	100
60°C条件下水浴显色 15min, 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。

五、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。

ALS (nmol/h/g 鲜

$$\text{重}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0217] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 921.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div W \times D$$

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。

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

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。

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

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。