

Acetolactate Synthase Assay Kit

乙酰乳酸合成酶 (ALS) 活性测定试剂盒

货号: G0442F | 方法: 可见分光法 | 规格: 24 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 60mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂一 | 粉体 mg×1 支 | 4°C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°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 |

三、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。

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°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 (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°C水浴中预热 10 min。

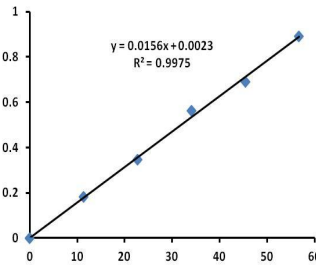
③ 在 EP 管中依次加入下列试剂:

| 试剂名称 (μL) | 样本管 | 对照管 |
|--|-----|-----|
| 试剂一 | 40 | |
| 试剂二 | 260 | 300 |
| 样本 | 100 | 100 |
| 35°C条件下, 暗反应 1h | | |
| 试剂三 | 40 | 40 |
| 60°C条件下水浴脱羧 15min | | |
| 试剂四 | 200 | 200 |
| 试剂五 | 200 | 200 |
| 60°C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。ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。 | | |

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调; 针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、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 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

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

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。

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

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。

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

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 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。