

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

(分光法 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℃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:

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℃×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:

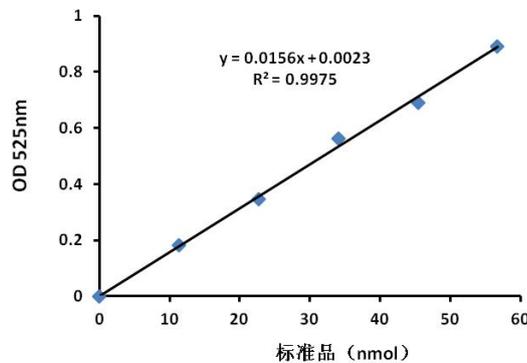
试剂名称 (μL)	样本管	对照管
试剂一	40	

试剂二	260	300
样本	100	100
35℃条件下，暗反应 1h		
试剂三	40	40
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。 $\Delta A=A$ 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 200 μ L，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： $y = 0.0156x + 0.0023$ ，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。

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

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。

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。