

## 乙酰乳酸合成酶（ALS）活性试剂盒（微板法）

产品货号：BA2881

产品规格：48样

### 产品简介：

乙酰乳酸合成酶(ALS, EC2.2.1.6)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 pyruvate =2-acetolactate+CO<sub>2</sub>。

### 试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存条件	备注
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃	
试剂一	粉体mg×1支	2-8℃	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	2-8℃	
试剂三	液体2mL×1支	2-8℃	
试剂四	液体10mL×1瓶	2-8℃	
试剂五	液体10mL×1瓶	2-8℃	
标准品	粉体×1支	2-8℃	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℃×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)；12000rpm4℃ 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<sup>4</sup>):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 30min，调节波长为 525nm。
- 2) 所有试剂于 25℃ 水浴中预热 10min。
- 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℃条件下，暗反应1h		



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

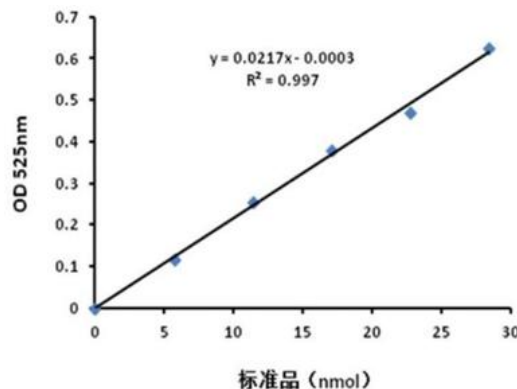
邮箱：zzlybio@126.com

试剂三	20	20
60℃条件下水浴脱羧15min		
试剂四	100	100
试剂五	100	100
60℃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。

#### 结果计算:

- 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。



- 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。

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

- 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。

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

- 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。

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

W---样品质量, g; V---提取液体积, 1mL; V1---上清液体积(mL), 0.05mL; T---反应时间, 1lh。

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:

- 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。
- 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, 0.05mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com