

乙酰乳酸合成酶(ALS)活性试剂盒(可见分光光度法)

产品货号: BA2880

产品规格: 24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: $2 \text{ pyruvate} \rightarrow 2\text{-acetolactate} + \text{CO}_2$

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60mL×1瓶	2-8°C	
试剂一	粉体mg×1支	2-8°C	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	2-8°C	
试剂三	液体2mL×1支	2-8°C	
试剂四	液体10mL×1瓶	2-8°C	
试剂五	液体10mL×1瓶	2-8°C	
标准品	粉体×1支	2-8°C	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,4C×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);12000rpm4C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30min,调节波长为525nm,蒸馏水调零。

2) 所有试剂于25C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	40	
试剂二	260	300
样本	100	100
35°C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

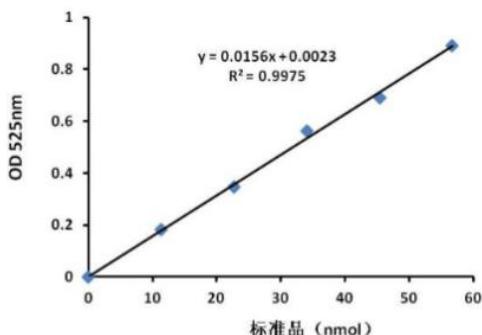
邮箱:zzlybio@126.com

试剂三	40	40
60°C条件下水浴脱羧15min		
试剂四	200	200
试剂五	200	200
60°C条件下水浴显色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。		
$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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。

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(nmol/h/g 鲜重)=[(ΔA -0.0023)÷0.0156]÷(W×V1÷V)÷T×D=641×(ΔA -0.0023)÷W×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(nmol/h/mg prot)=[(ΔA -0.0023)÷0.0156]÷(Cpr×V1)÷T×D=641×(ΔA -0.0023)÷Cpr×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(nmol/h/ 10^4 cell)=[(ΔA -0.0023)÷0.0156]÷(500×V1÷V)÷T×D=1.28×(ΔA -0.0023)×D

W---样品质量, g; V---提取液体积, 1mL; 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:

- 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。



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

扫一扫 加微信