

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

(货号: ADS-W-N025 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再加 1.2mL 蒸馏水混匀溶解, 仍 4℃保存。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	1. 加入 1ml 浓硫酸, 混匀后, 备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30 min, 调节波长为 525nm。

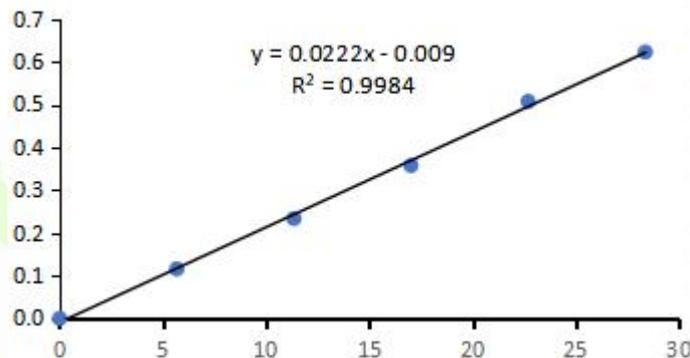
- ② 所有试剂于 25°C 水浴中预热 10 min。
③ 在 EP 管中依次加入下列试剂：

试剂组分 (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 = 0.0222x - 0.009, 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。

$$ALS (\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0222] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 900.9 \times (\Delta A + 0.009) \div W \times D$$

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。

$$ALS (\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0222] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 900.9 \times (\Delta A + 0.009) \div Cpr \times D$$

4、按细菌数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 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。

$$ALS (\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.009) \div 0.0222] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 1.8 \times (\Delta A + 0.009) \times D$$

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 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水混匀溶解，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 0.05mg/mL 的标品稀释液待用。

标品浓度 mg/mL	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

- 3 依据对照管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线，标准品乙酰甲甲醇的摩尔质量为 88.11。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
试剂二	150	150
标品	50	
蒸馏水		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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		