

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: $2 \text{ pyruvate} = 2\text{-acetolactate} + \text{CO}_2$ 。

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	



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

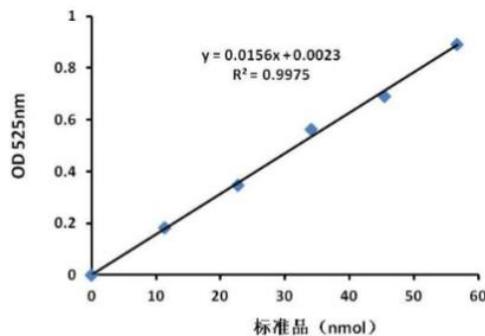
http://www.saint-bio.com

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 V_1 (如增至200 μL , 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 V_1 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。

$$ALS(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.0023) \div 0.0156] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 641 \times (\Delta A - 0.0023) \div W \times D$$

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。

$$ALS(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0023) \div 0.0156] \div (Cpr \times V_1) \div T \times D = 641 \times (\Delta A - 0.0023) \div Cpr \times D$$

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。

$$ALS(\text{nmol/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A - 0.0023) \div 0.0156] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D = 1.28 \times (\Delta A - 0.0023) \times D$$

W ---样品质量, g; V ---提取液体积, 1mL; V_1 ---上清液体积(mL), 0.1mL; T ---反应时间, 11h。

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, 0.05mg/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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com