

乙酰乳酸合成酶（ALS）活性检测试剂盒（微量法）

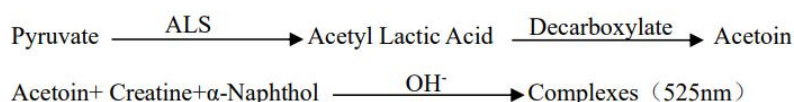
产品货号：BA2262

产品规格：50T/24S；100T/48S

产品说明：

乙酰乳酸合成酶(Acetolactate Synthase, ALS, EC 4.1.3.18), 又称乙酰羟乙酸合成酶(Acetohydroxyacid synthase, AHAS)。ALS存在于植物生长的过程中, 是诱导支链氨基酸(Ile、Leu、Val)生物合成过程中第一阶段的关键酶。

ALS催化丙酮酸生成乙酰乳酸, 乙酰乳酸在一定条件下脱羧生成乙偶姻, 乙偶姻在碱性环境下与肌酸和 α -萘酚反应生成红色物质, 在525nm下有最大吸光值。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

产品组成：

试剂名称	50T规格	100T规格	保存条件
试剂一 A	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃
试剂一 B	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃
试剂一 C	液体120mL×1瓶	液体120mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体15mL×1瓶	液体30mL×1瓶	2-8℃
试剂三 A	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃
试剂三 B	粉剂×1支	粉剂×1支	-20℃
试剂三 C	液体60mL×1瓶	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体1.6mL×1瓶	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂五	液体8mL×1瓶	液体12mL×1瓶	2-8℃
试剂六	粉剂×1瓶	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂六稀释液	液体8mL×1瓶	液体15mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1瓶	液体1mL×1瓶	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前将试剂一A，试剂一B溶于试剂一C中，充分溶解。未用完的试剂分装保存，-20℃保存可以保存4周，避免反复冻融。
2. 试剂三：临用前将试剂三A，试剂三B溶于试剂三C中，充分溶解。未用完的试剂分装保存，-20℃保存可以保存4周，避免反复冻融。
3. 试剂六：临用前加入1mL无水乙醇溶解。-20℃可保存4周。
4. 试剂六工作液：临用前根据样本量按试剂六：试剂六稀释液=0.1mL：0.7mL（共0.8mL，8T）的比例配制，现用现配。当天用完。
5. 标准品：100 μ mol/mL乙偶姻标准液（即10⁵nmol/mL乙偶姻标准液）。
6. 100nmol/mL标准溶液的配制：取10⁵nmol/mL 乙偶姻标准液50 μ L和950 μ L蒸馏水混合，即5000nmol/mL标准溶液；再取20 μ L 5000nmol/mL标准溶液和980 μ L蒸馏水混合，即100nmol/mL标准溶液。

自备材料：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96



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

孔板、研钵/匀浆器、蒸馏水、冰，无水乙醇 (>98%，AR) 和硫酸铵 (>98%，AR)。

测定步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

- 按照组织质量 (g) : 试剂一 体积 (mL) 为 1: 2~4 的比例 (建议称取约 0.5g 到 1g 组织，加入试剂一 一定容至 2mL)，进行冰浴匀浆。15000g 4℃ 离心 20min。取 1mL 上清，转移至新的 2mL EP 管中。
- 在取出的上清中加入约 0.5g 硫酸铵，充分溶解后 4℃ 静置 2h。然后 15000g 4℃ 离心 20min，弃掉上清。沉淀中加入 0.5mL 试剂二，充分溶解冰上待用 (若按蛋白浓度计算，则用此粗酶液自行测定蛋白浓度)。

二、测定步骤

- 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 525nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 在 1.5mL EP 管中按下表步骤加样:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管	标准管	标准空白管
样本	200	200	-	-
试剂三	200	200	-	-
试剂四	-	20	-	-
37℃ 避光反应 1 小时				
试剂四	20	-	-	-
充分混匀，60℃ 反应 15min，取出后 8000g 离心 5min，取上清于新的 EP 管中				
上清液	200	200	-	-
标准品	-	-	200	-
蒸馏水	-	-	-	200
试剂五	100	100	100	100
试剂六工作液	100	100	100	100
充分混匀，60℃ 反应 15min，然后取 200 μL 于微量玻璃比色皿/96 孔板中，测定 525nm 处吸光值，记作 A 测定，A 对照，A 标准，A 标准空白。 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{标准空白}$ 。 (标准管和标准空白管只需做 1-2 次)				

三、乙酰乳酸合成酶活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 37℃ 每 mg 组织蛋白每小时催化产生 1nmol 乙酰乳酸定义为一个酶活力单位。

$$ALS \text{ 活性 (U/mg prot)} = C_{标准} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_{酶促} \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T \times F = 210 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div C_{pr} \times F$$

2. 按样本质量计算:

单位的定义: 37℃ 每 g 组织每小时催化产生 1nmol 乙酰乳酸定义为一个酶活力单位。

$$ALS \text{ 活性 (U/g 质量)} = C_{标准} \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \times V_{酶促} \div (W \div 2 \div V_{提取} \times V_{样}) \div T \times F = 210 \times \Delta A_{测定} \div \Delta A_{标准} \div W \times F$$

C 标准: 标准溶液浓度, 100nmol/mL; V 酶促: 37℃ 反应体系体积, 0.42mL; V 提取: 加入的试剂三体积, 0.5mL;

V 样: 加入的样本体积, 0.2mL; T: 37℃ 反应时间, 1h; Cpr: 蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 2: 2mL 样本匀浆取 1mL; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

- 如果 $\Delta A_{测定}$ 大于 1，可以对样品进行稀释或者缩短 37℃ 反应时间; 测定吸光值或 $\Delta A_{测定}$ 小于 0.01，可以加大样本量或者延长 37℃ 反应时间。最终计算时同步修改计算公式。



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