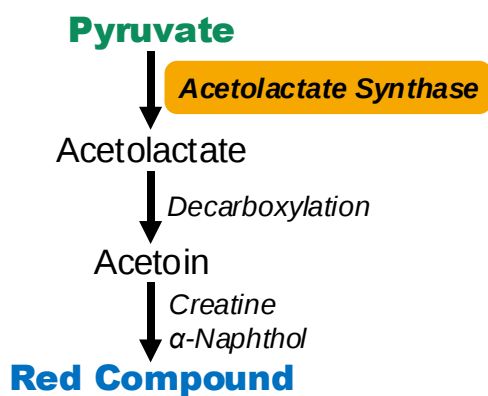




乙酰乳酸合成酶 (ALS) 活性检测试剂盒

Acetolactate Synthase (ALS) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



乙酰乳酸合成酶 (ALS) 活性检测试剂盒

Acetolactate Synthase (ALS) Activity Assay Kit

一、产品描述

乙酰乳酸合成酶 (Acetolactate Synthase, ALS), 广泛存在于植物和微生物中, 是诱导支链氨基酸生物合成过程中第一阶段的关键酶, 能以高度专一性和极高的催化效率催化丙酮酸为乙酰乳酸, 从而影响支链氨基酸的生物合成, 由于具有对嘧啶羧酸类除草剂很高的专一抗性, 可以作为选择标记, 近年来在农业农药领域具有广泛应用。

乙酰乳酸合成酶可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能够与肌酸和 α -萘酚反应生成红色物质, 产物在 525 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征乙酰乳酸合成酶的活性。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
试剂一	组分 A	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	使用前将组分 B 和组分 C 加入组分 A 中充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
	组分 B	粉剂×1 支	-20°C 保存	
	组分 C	粉剂×1 支	-20°C 保存	
试剂二		液体 15 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	组分 A	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	使用前将组分 B 和组分 C 加入组分 A 中充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
	组分 B	粉剂×1 支	-20°C 保存	
	组分 C	粉剂×1 支	-20°C 保存	
试剂四		液体 1.6 mL×1 支	4°C 保存	-
试剂五		液体 16 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂六		粉剂×2 瓶	4°C 保存	使用前加入 1 mL 无水乙醇充分溶解 (分装后-20°C可保存一个月, 避免反复冻融)
试剂七		液体 16 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准液		液体 1 mL×1 支	4°C 保存	100 μ mol/mL 乙偶姻标准液
标准应用液的制备 (现用现配): 使用前将 100 μ mol/mL 乙偶姻标准液使用蒸馏水稀释 1000 倍至 100 nmol/mL 即为标准应用液。				

需自备试剂: 硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MW=132.14, CAS:7783-20-2; 无水乙醇 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, MW=46.07, CAS: 64-17-5;

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱、硫酸铵、无水乙醇和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1:（2-5）的比例（建议称取 0.5 g 组织，加入 2 mL 试剂一）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 15000 g 离心 20 min，吸取 1 mL 上清液至新的离心管中，加入 0.5 g 硫酸铵，充分溶解，4℃ 静置 2 h，4℃ 15000 g 离心 20 min，弃上清，留沉淀；沉淀中加入 0.5 mL 试剂二，充分溶解即为粗酶液。

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 525 nm，蒸馏水调零。

②试剂六应用液的制备（现用现配）：使用前按试剂六：试剂七=1:7 的体积比配制。

③在离心管中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
粗酶液	300	300	-	-
试剂三	300	300	-	-
试剂四	-	30	-	-
充分混匀，37℃避光反应 60 min				
试剂四	30	-	-	-
充分混匀，60℃反应 15 min； 8000 g 常温离心 5 min，取上清液；				
上清液	500	500	-	-
标准应用液	-	-	500	-
蒸馏水	-	-	-	500
试剂五	250	250	250	250
试剂六应用液	250	250	250	250
充分混匀，60℃反应 15 min				

吸光值测定：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 525 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样本均需设置一个对照管，标准管和空白管只需测定 1-2 次。

3. 乙酰乳酸合成酶 (ALS) 活性计算

① 按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每小时生成 1 nmol 乙酰乳酸定义为一个酶活力单位。

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

② 按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每小时生成 1 nmol 的乙酰乳酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ALS (U/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{S1}} \times V_{\text{样总}}}{\Delta A_{\text{标准}} \times W \times V_{\text{样}} \times V_{\text{上清}} \times T} = \frac{210 \times \Delta A}{W}$$

注释： C 标：标准应用液浓度，100 nmol/mL；V 酶促：酶促反应体积，0.63 mL；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.3 mL；V 样总：粗酶液总体积，0.5 mL；V_{S1}：提取过程中试剂一的体积，2 mL；V 上清：提取过程中吸取上清液的体积，1 mL；T：酶促反应时间，1 h；C_{pr}：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

四、注意事项

① 若 A 测定或 ΔA 测定大于 0.9，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当增加样本量或延长酶促反应时间（37°C 反应时间）后再进行测定，计算时相应修改；

② 为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

