

## 乙酰乳酸合成酶（Acetolactate Synthase）试剂盒说明书

### 微量法 50 管/24 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 测定意义：

乙酰乳酸合成酶（Acetolactate Synthase），存在于植物生长过程中，它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。

#### 测定原理：

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  $\alpha$ -萘酚反应生成红色物质，在 525nm 下有最大吸光值。

#### 需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、可调式移液器、96 孔板、研钵、硫酸铵、冰和蒸馏水。

#### 试剂的组成和配制：

缓冲液：100mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存；临用前加入 60mL 缓冲液充分溶解，用不完的试剂-20℃ 避光保存。

试剂二：30mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 避光保存；临用前加入 12mL 缓冲液溶解待用，用不完的试剂-20℃ 避光保存；

试剂四：1.5mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：6mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂六：粉剂×2 瓶，4℃ 避光保存；临用前加入 3mL 试剂七溶解待用，现配现用。

试剂七：10mL×1 瓶，4℃ 保存。

#### 粗酶液的提取：

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，加入试剂一定容至 2mL），进行冰浴匀浆。17000g 4℃ 离心 20min。取 1mL 上清，转移至新的 EP 管。

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 17000g 4℃ 离心 20min，弃掉上清。沉淀中加入 0.5mL 试剂二，充分溶解待用。用不完的本-20℃ 保存。

#### 测定步骤：

在 EP 管中加入如下试剂

	测定管	对照管
样本上清（ $\mu\text{L}$ ）	200	200
试剂三（ $\mu\text{L}$ ）	200	200
试剂四（ $\mu\text{L}$ ）		20
充分混匀，37℃ 避光反应 60min。		
试剂四	20	
充分混匀，60℃ 反应 15min，取出后 8000g 离心 5min，取上清		
反应液上清（ $\mu\text{L}$ ）	200	200
试剂五	100	100
试剂六	100	100

充分混匀，60℃ 反应 15min，然后取 200 $\mu\text{L}$  于 96 孔板中，测定 525nm 处初始吸光值 A 测定

与 A 对照。ΔA=A 测定-A 对照。

**ALS 活性计算：**

标准曲线  $y = 0.2438x - 0.0096$ ,  $R^2 = 0.997$ ; 其中 x 为标准品浓度,  $\mu\text{mol/mL}$ , y 为吸光值 ΔA

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的乙酰乳酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{ALS (nmol /min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0096) \div 0.2438 \times V_{\text{样}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 \\ &= 68.36 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的乙酰乳酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{ALS (nmol /min /g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0096) \div 0.2438 \times V_{\text{样}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 68.36 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

V 样：加入样本体积，0.2 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，60 min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。