

二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）试剂盒说明书

微量法 100管/96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：

二磷酸核酮糖羧化酶（EC 4.1.1.39）是植物光合作用中的一个关键酶，既控制着CO₂的固定，同时又制约着碳素向Calvin循环和光呼吸循环分流，其活性的大小直接影响着光合速率。

测定原理：

在Rubisco的催化下，1分子的核酮糖-1, 5-二磷酸（RuBP）与1分子的CO₂结合，产生2分子的3-磷酸甘油酸（PGA），PGA可通过外加的3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用，产生甘油醛-3-磷酸，并使还原型辅酶I（NADH）氧化。因此，340nm吸光度的变化可计算还原型辅酶I氧化速率，还原型辅酶I氧化速率可反应Rubisco的活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液一：液体100mL×1瓶，4℃保存。

提取液二：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：25mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入10mL试剂一，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入10mL试剂一，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂四：粉剂×1瓶，-20℃保存；临用前加入1 mL试剂一，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（注意：试剂二、三、四溶解后，按需分装-20℃保存。）

粗酶液制备：

①总Rubisco酶提取：建议称取约0.1g样本，加入1mL提取液一，冰浴匀浆后超声破碎（冰浴，200W，破碎3s，间歇7s，总时间1min），然后4℃，8000g离心10min，取上清测定。

②胞浆和叶绿体Rubisco酶的分离：按照植物组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g样本，加入1mL提取液一），冰浴匀浆后于4℃，200g离心5min，弃沉淀，取上清在4℃，8000g离心10min，取上清用于测定胞浆Rubisco酶活性，取沉淀加1mL提取液二，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎3s，间歇7s，总时间1min），然后4℃，8000g离心10min，取上清测定叶绿体中Rubisco酶活性。

建议测定总Rubisco酶活性，按照步骤①提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的Rubisco，则按照步骤②提取粗酶液。

（注意：粗酶液制备过程中超声破碎操作使用细胞破碎仪进行。）测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定
 1. 工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三1：1混合，用多少配多少；
 2. 在微量石英比色皿或96孔板中加入10uL样本、10uL试剂四和180uL工作液，混匀，立即记录340nm处20s时吸光值A1和5min20s时的吸光值A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

Rubisco活性计算：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 25°C中1 mg蛋白1 min氧化1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要测定粗酶液中蛋白质浓度, 建议选购本公司生产的BCA蛋白质浓度测定试剂盒。

2、按样本鲜重计算

单位的定义: 25°C中1 g组织1 min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义:

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.01 mL; V样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5min; W: 样本质量, g。

b.使用96孔板测定的计算公式如下:

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 25°C中1 mg蛋白1 min氧化1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要测定粗酶液中蛋白质浓度, 建议选购本公司生产的BCA蛋白质浓度测定试剂盒。

2、按样本鲜重计算

单位的定义: 25°C中1 g组织1 min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义:

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol /cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V样: 加入样本体积, 0.01mL; V样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 min; W: 样本质量, g。