

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：AC10151

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 0.5 mL 蒸馏水充分溶解待用，振荡溶解后若出现浑浊可以离心使用；
- 2、试剂四：临用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解待用；
- 3、工作液的配制：临用前在试剂二中加入全部试剂一，充分混匀，在 25°C 孵育 5min。

产品说明：

1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶 (Rubisco, 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。

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，伴随着NADH氧化生成NAD⁺；在340 nm NADH有特征吸收峰，而NAD⁺没有此吸收峰，因此测定340nm吸光度下降速率可以代表Rubisco的羧化酶活性。

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/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UV板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

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）

1、细菌或细胞样本的制备：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。建议选取新鲜的植物样本。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、按下表步骤加样：

试剂名称	测定管	空白管
样本 (μL)	20	-
蒸馏水 (μL)	-	20
试剂三 (μL)	7	7
试剂四 (μL)	7	7
工作液 (μL)	180	180

记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。反应温度保持在 25°C。（空白管只做 1-2 管）

三、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中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 344 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

单位的定义：25°C中每 g 组织每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco活力 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 344 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：25°C中每1万个细菌或细胞每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.69 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2.14×10^{-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，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

b.使用96孔板测定的计算公式如下：

将上述公式中光径d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算。

实验实例：

- 1、取 0.1g 植物叶片，加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定=1.2647-1.1825=0.0822， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.8649-0.8502=0.0147， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0822-0.0147=0.0675，按样本质量计算酶活得：
Rubisco 活力 (U/g 质量) = $344 \times \Delta A \div W = 344 \times 0.0675 \div 0.1 = 232.2$ U/g 质量。