

二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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℃中 1 mg 蛋白 1 min 氧化 1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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℃中 1 g 组织 1 min 氧化 1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

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℃中 1 mg 蛋白 1 min 氧化 1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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℃中 1 g 组织 1 min 氧化 1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

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。
