

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0526

Size: 100T/96S

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

核酮糖-1, 5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶 (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。

二、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。

三、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 (uv板) 、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	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	
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 700uL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周；
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 700uL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周

五、粗酶液制备：

按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

六、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：临用前在试剂二中加入 22.5mL 试剂一，充分混匀，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；现配现用；

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 6uL 样本、7uL 试剂三、7uL 试剂四和 180uL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 2min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、Rubisco 活性计算：

● 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 1mg 蛋白 1min 氧化 1nmol NADH。Rubisco 活力 (nmol/min /mg prot)

$$= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 2680 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要测定粗酶液中蛋白质浓度，建议选购本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（货号：ZC-S0470）。

2、按样本鲜重计算

单位的定义：25℃中1g组织1min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 2680 \times \Delta A \div W$$

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，0.006 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；

● 使用96孔板（uv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1mg蛋白1min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 5360 \\ \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要测定粗酶液中蛋白质浓度，建议选购本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（货号：ZC-S0470）

2、按样本鲜重计算：

单位的定义：25℃中1g组织1min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ T = 5360 \times \Delta A \div W$$

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，0.006mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；