

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-S0823

Size: 25T/24S

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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 CO_2 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 CO_2 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:

可见-紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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	25mL×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 875uL 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 875uL 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. 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 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 25℃孵育 5min；现配现用；
3. 测定：在 1mL 石英比色皿中依次加入 30uL 样本、35uL 试剂三、35uL 试剂四和 900u 工作液，混匀；记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 2min 20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

七、Rubisco 活性计算：

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：25°C 中 1mg 蛋白 1min 氧化 1 nmol NADH。

$$\begin{aligned} \text{Rubisco 活力 (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 2680 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

此法需要测定粗酶液中蛋白质浓度,建议选购本公司BCA蛋白法含量检测试剂盒(ZC-S0470)。

2、按样本鲜重计算

单位的定义：25°C 中 1g 组织 1min 氧化 1 nmol NADH。

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

上述计算公式中各符合含义：

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} 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，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2min；W：样本质量，g。