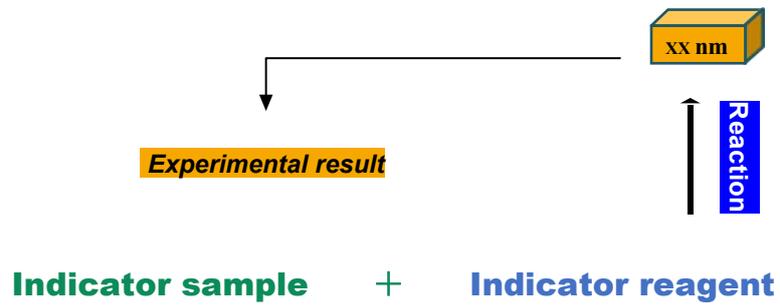


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 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

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。

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 (uv板)、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

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

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。

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 $\Delta A=A1-A2$ 。

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 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°C 中 1g 组织 1min 氧化 1nmol NADH。
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;

b. 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°C 中 1mg 蛋白 1min 氧化 1nmol NADH。
Rubisco 活力 (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 5360 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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°C 中 1g 组织 1min 氧化 1nmol NADH。
Rubisco 活力 (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$
 $= 5360 \times \Delta A \div W$

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;