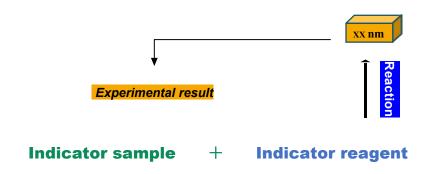


上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图



货号: ZC-S0822 规格: 50管/48样

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

产品内容:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	50mL×1 瓶	4℃保存	_
试剂一	50mL×1 瓶	4℃保存	_
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	_
试剂三	粉剂×1 瓶	-20 6 休仔	临用前加入1.75mL 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 0 休代	临用前加入1.75mL 蒸馏水充分溶解待用;用不完的试剂4℃保存一周

产品说明:

核酮糖-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。

测定原理:

- (1) 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);
- (2) 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[†]:
- (3) 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。

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。

操作步骤:

一、粗酶液制备:

按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1: $5^{\sim}10$ 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° C离心10min,取上清,置冰上待测。



二、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45mL 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900uL工作液,混匀:记录340nm 处20 s 时吸光值A1 和2 min 20 s 时的吸光值A2. 计算 Δ A=A1-A2。

三、Rubisco 活性计算:

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 n mol NADH。

Rubisco 活力(nmol/min /mg prot)=[ΔΑ×V 反总÷(ε×d)×10°]÷(V 样×Cpr)÷T =2680×ΔΑ÷Cpr

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1 nmol NADH。

Rubisco活力(nmol/min/g鲜重)=[ΔA×V 反总÷(ε×d)×10°]÷(V 样÷V 样总×W)÷ T=2680×ΔA÷W

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, 2 min; W: 样本质量, g。

Shanghai ZCIBIO Technology Co.,Ltd. TEL:021-65681082 Email:zcibio@163.com www.zcibio.com