

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（Rubisco）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHB9/AYFA1 -M48	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 （Rubisco）活性检测试剂盒说明书	48T	微量法
PMHB9/AYFA1 -M96		96T	

一、测定意义：

Rubisco是光合作用中决定碳同化速率的关键酶，其活性的大小直接影响着光合速率。

二、测定原理：

通过测定340nm吸光度下降速率可以代表Rubisco的羧化酶活性，这种方法基于Rubisco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），进而通过外加的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⁺，在340nm处NADH有特征吸收峰，而NAD⁺没有此吸收峰，从而通过测定340nm吸光度下降速率来反映Rubisco的羧化酶活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 50mL×1 瓶	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15mL×1 瓶	液体 30mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂二：每瓶加 5ml 双蒸水，现用现配，配完-20℃可保存一周。			
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂三：每瓶加 3.6ml 双蒸水，现用现配，配完-20℃保存。			
试剂四	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	-20℃保存
试剂四：每支加 0.6ml 双蒸水，现用现配，配完-20℃保存。			
工作液的配制：临用前将试剂一、试剂二和试剂三按 13:2:3 混合，用多少配多少；			

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、植物：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞: 按照细胞数量 10^4 个: 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3 min), 5000 rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。

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. 测定前将试剂恢复至常温;
3. 操作表:

	测定管	空管
样品 (μL)	20	-
蒸馏水 (μL)	-	30
工作液 (μL)	180	180
试剂四 (μL)	10	-
记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1_{测定} - A2_{测定}$ 。 $\Delta A_{空白} = A1_{空白} - A2_{空白}$; $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。(空白管只做 1-2 管)		

四、二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性计算:

1、二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 计算

(1) 按样本鲜重计算:

单位定义: 25℃ 中 1g 组织 1min 氧化 1nmolNADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 25℃ 中 1mg 蛋白 1min 氧化 1nmolNADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

单位定义: 25℃ 中每 1 万个细菌或细胞每分钟氧化 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (U/104 cell)} = (U/104 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L;

ε: NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.05mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 5min;

109: 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$;

W: 样本质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

五、 注意事项:

1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测;