

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-C24	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 （Rubisco）试剂盒	24T	常量法
PMHB9-C48		48T	常量法

产品说明：

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。

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，伴随着NADH氧化生成 NAD⁺；在340nm 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。

试剂组成：

试剂名称/规格	25T	50T	保存条件
提取液	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
试剂三	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存

25T 溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前取 1 支加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解待用，振荡溶解后若出现浑浊可以离心使用；
- 2、试剂四：临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解待用；
- 3、工作液的配制：临用前在试剂二中加入全部试剂一，充分混匀，在 25℃ 孵育 5min。

50T 溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前取 1 支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解待用，振荡溶解后若出现浑浊可以离心使用；
- 2、试剂四：临用前加入 2 mL 蒸馏水充分溶解待用；
- 3、工作液的配制：临用前在试剂二中加入全部试剂一，充分混匀，在 25℃ 孵育 5min。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌或细胞样本的制备：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每500 万细菌或细胞加入1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，超声3s，间隔10s，重复30次）；10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、称取约0.1g 组织加入1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。建议选取新鲜的植物样本。

二、测定步骤

1．紫外分光光度计预热30min 以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2．按下表步骤加样：

试剂名称	测定管	空白管
样 本 (μL)	100	-
蒸 馏 水 (μL)	-	100
试剂三 (μL)	35	35
试剂四 (μL)	35	35
工作液 (μL)	900	900

记录340nm 处20s 时吸光值A1 和5min20s 时的吸光值A2，计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定。 ΔA 空白=A1 空白-A2 空白； $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。反应温度保持在25℃。
(空白管只做 1-2 管)

三、Rubisco 活性计算

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

Rubisco活力 (U/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 344 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

2. 按样本质量计算

单位的定义：25℃中每 g组织每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

Rubisco活力 (U/g 质量) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 344 \times \Delta A \div W$

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：25℃中每1万个细菌或细胞每分钟氧化1nmol

NADH为一个酶活力单位。 Rubisco活力 (U/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V$

反总÷ (ε×d) ×10⁹]÷(V样÷V样总×500) ÷T=0.69×ΔA

V反总：反应体系总体积，1.07×10⁻³L；ε： NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm； d：比色皿光径，1cm； V 样： 加入样本体积，0.1mL； V样总： 加入提取液体积，1mL； T： 反应时间，5min； W： 样本质量， g； 500： 细 胞或细菌总数，500万； 10⁹： 单位换算系数，1mol=10⁹nmol。