植物二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）试剂盒

（货号：G0602F48 紫外法 48 样）

一、产品简介：

核酮糖-1,5-二磷酸核酮糖羧化酶（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，初始活性可反映体内酶的活化状态，总活性为体内已活化的酶加上潜在活化的酶活性。

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），在 3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的共同作用下，产生甘油醛-3-磷酸，并使还原型辅酶 I（NADH）氧化。因此，通过检测 340nm 下 NADH 的下降速率，即可得出 Rubisco 的酶活性大小，为了使 NADH 的氧化和 CO_2 的固定同步。本试剂盒加入了 ATP 再生系统。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×3 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支分别加 0.75mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体μL×1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再分别加 2.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后保存，禁止反复冻融。
试剂三	粉剂 mg×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 2mL×1 支	-20℃保存	一次性用不完可分装保存于-20℃。

【注】本试剂盒仅提供 48 个样本的初始活性检测或者 48 个样本的总活性检测。

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.1g 组织样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注意】 若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 的 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

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 **提示：一般以检测初始活性为主。若检测总活性则该试剂盒从可以检测 48 个样本减少为 24 个样本。**

③ 所有试剂解冻至室温（25℃），在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（μL）	初始活性测定管	总活性测定管
样本	30	30
试剂一	40	40
试剂二	40	40
试剂三	40	40
试剂四	500	500
试剂五	40	混匀，4℃孵育 15min
		40
轻轻混匀，室温（25℃）条件下，于 340nm 处检测，10s（待反应体系稳定）时读取 A1，10 min 后读取 A2，ΔA=A1-A2。		

【注】 1.初始活性测定管，加完试剂五后立即按照操作说明书检测；总活性测定管于 4℃孵育 15min 后再加试剂五，再按照操作说明书检测；

2.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 后再读值。

3.若△A 在零附近，可适当延长反应时间 T（如由 10min 延长到 20min 后读 A2），或增加 V1(由 30μL 增至 60μL，则试剂四相应减少），则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

4.若 A1 值太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可适当减少样本加样量 V1(由 30μL 减至 10μL，可用蒸馏水补充），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

5.若ΔA 值大于 0.4，则需减少反应时间 T（如减至 5min），则改变后 T 需代入公式重新计算。

6.若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol/min /mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=369.8×ΔA÷Cpr

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1 nmol CO_2 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol CO_2/min/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr)÷2÷T=184.9×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=369.8×ΔA÷W

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1 nmol CO_2 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol CO_2/min/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷2÷T=184.9×ΔA÷Cpr

3、按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=369.8×ΔA÷500

V--加入提取液体积，1 mL； V1--加入样本体积，0.03mL； d--光径，1cm；

V2--反应体系总体积，6.9×10^{-4} L；ε--NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm； W--样本质量，g；

2--每固定 1 nmol CO_2 有 2 nmolNADH 被氧化； T--反应时间，10min； 500--细胞数量，万；

Cpr--蛋白浓度（mg/mL），建议使用本公司的 BCA 蛋白含量测定试剂盒。