

二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 试剂盒

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

测定意义:

二磷酸核酮糖羧化酶 (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:

(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。

组成:

产品名称	PSS006-25T/24S	PSS006-50T/48S	Storage
提取液一: 液体	25ml	50ml	4°C
提取液二: 液体	25ml	50ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	60ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
试剂四: 粉剂	1 瓶	1 瓶	-20°C
说明书	一份		

PSS006-25T/24S 试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 12.5ml 试剂一, 充分混匀待用; 用不完的 PSS006-25T/24S 试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

PSS006-25T/24S 试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 12.5ml 试剂一, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

PSS006-25T/24S 试剂四: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 1.25 ml 试剂一, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

PSS006-50T/48S 试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 25ml 试剂一, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

PSS006-50T/48S 试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 25ml 试剂一, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



PSS006-50T/48S 试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 2.5 ml 试剂一，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

(注意：试剂二、三、四溶解后，按需分装-20℃保存。)

自备仪器和用品：

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。

粗酶液制备：

①**总 Rubisco 酶提取**：建议称取约 0.1g 样本，加入 1ml 提取液一，冰浴匀浆后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定。

②**胞浆和叶绿体 Rubisco 酶的分离**：按照植物组织质量 (g)：提取液体积(ml)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 样本，加入 1ml 提取液一），冰浴匀浆后于 4℃，200g 离心 5min，弃沉淀，取上清在 4℃，8000g 离心 10min，取上清用于测定胞浆 Rubisco 酶活性，取沉淀加 1ml 提取液二，震荡溶解后超声破碎（冰浴，200W，破碎 3s，间歇 7s，总时间 1min），然后 4℃，8000g 离心 10min，取上清测定叶绿体中 Rubisco 酶活性。

建议测定总 Rubisco 酶活性，按照步骤①提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 Rubisco，则按步骤②提取粗酶液。

(照注意：粗酶液制备过程中超声破碎操作使用细胞破碎仪进行。)

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、样本测定

(1) 工作液的配制：临用前将试剂二和试剂三 1: 1 混合，用多少配多少；

(2) 在 1ml 石英比色皿中加入 50ul 样本、50ul 试剂四和 900ul 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

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。

$\text{Rubisco (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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。

$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 643 \times \Delta A \div W$

上述计算公式中各符合含义：

V 反总：反应体系总体积， 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，0.05 ml；V 样总：加入提取液体积，1ml；T：反应时间，5 min；W：样本质量，g。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

