

植物二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 试剂盒说明书

(微板法 96 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。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 CO₂ 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 CO₂ 的固定同步。本试剂盒加入了 ATP 再生系统。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×3 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部, 每支分别加 0.74mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体 μL×1 支	-20°C保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×1 支	4°C保存	
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	液体 2mL×1 支	-20°C保存	一次性用不完可分装保存于-20°C。

【注】 本试剂盒仅提供 96 个样本的初始活性检测或者 96 个样本的总活性检测。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

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°C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°C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°C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°C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 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 所有试剂解冻至室温 (25°C)

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 96 个样本

减少为 48 个样本。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	初始活性测定管	总活性测定管
样本	10	10
试剂一	20	20
试剂二	10	10
试剂三	10	10
试剂四	130	130
试剂五	20	混匀, 25°C 孵育 15min
		20
轻轻混匀, 室温 (25°C) 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, $\Delta A=A1-A2$ 。		

- 【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 25°C 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 ΔA 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 10μL 增至 30μL, 则试剂四相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
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), 可以适当减少样本加样量 V1 (由 10μL 减至 5μL, 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), 则改变后的 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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V1 \times Cpr) \div T=643.1 \times \Delta A \div Cpr$

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1 nmol CO₂ 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol CO₂/min/mg prot)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V1 \times Cpr) \div 2 \div T=321.6 \times \Delta A \div Cpr$

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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V1 \div V) \div T=643.1 \times \Delta A \div W$

单位定义：每克组织在每分钟内固定 1 nmol CO₂ 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol CO₂/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V1 \div V) \div 2 \div T=321.6 \times \Delta A \div W$

3、按细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 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/10⁴ cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V1 \div V) \div T=643.1 \times \Delta A \div 500$

V--加入提取液体积, 1 mL; V1--加入样本体积, 0.01mL; d--96 孔板光径, 0.5cm;

V2--反应体系总体积, 2×10⁴ L; ε--NADH 摩尔消光系数, 6.22×10³ L / mol / cm; W--样本质量, g;

2---每固定 1 nmol CO₂ 有 2 nmol NADH 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。