

植物二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-GH004-48 微板法 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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使粉剂落入底部，分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体 1 支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部，再分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	粉剂 1 支	4℃保存	
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1 支	-20℃保存	临用前加 1mL 蒸馏水，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：

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℃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（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℃）。

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 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℃孵育 15min
		20
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， $\Delta A=A1-A2$ 。		

- 【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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol CO}_2/\text{min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div 2 \div T = 321.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol CO}_2/\text{min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div 2 \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min/10}^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div 500$$

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, 2×10⁻⁴ 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。