

植物二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-GH004 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 3 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.74mL 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	每支:
试剂三	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 分别加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后保存, 禁止反复冻融。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1 瓶	-20℃保存	1. 临用前加 2ml 蒸馏水; 2. 一次性用不完可分装保存于-20℃。

【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、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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, 可在样本提取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、检测步骤：

- 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 96 个样本减少为 48 个样本。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（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℃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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(V1×Cpr)÷T=643.1× $\Delta A \div Cpr$

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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(V1×Cpr)÷2÷T=321.6× $\Delta A \div Cpr$

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

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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(W×V1÷V)÷2÷T=321.6× $\Delta A \div W$

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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(500×V1÷V)÷T=643.1× $\Delta A \div 500$

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, 6.22×10^3 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。

