

Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) Assay Kit

植物二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 试剂盒说明书

货号:BN72210 | 方法:微板法 | 规格: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 mg×2 支	-20℃保存	使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 μL×1 支	-20℃保存	使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 mg×1 支	4℃保存	
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1mL×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:

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，4℃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，ΔA=A1-A2。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 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。