

## 二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

**注 意：**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CO<sub>2</sub>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：**

在 Rubisco 的催化下，1 分子的核酮糖-1, 5-二磷酸 (RuBP) 与 1 分子的 CO<sub>2</sub> 结合，产生 2 分子的 3-磷酸甘油酸 (PGA)，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，并使还原型辅酶 I (NADH) 氧化。因此，340nm 吸光度的变化可计算还原型辅酶 I 氧化速率，还原型辅酶 I 氧化速率可反应 Rubisco 的活性。

**需自备的仪器和用品：**

分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

**试剂的组成和配制：**

提取液一：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

提取液二：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：25mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 10mL 试剂一，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 10mL 试剂一，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 1 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。)

**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，则按照步骤②提取粗酶液。

(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、 分光光度计或酶标仪预热 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) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10uL样本、10uL试剂四和180uL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：**

##### **a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：**

###### 1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：25℃中1mg蛋白1min氧化1nmol 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1g组织1min氧化1nmol NADH。

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

上述计算公式中各符合含义：

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5min；W：样本质量，g。

##### **b.使用96孔板测定的计算公式如下：**

###### 1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：25℃中1mg蛋白1min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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1g组织1min氧化1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义：

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；W：样本质量，g。