

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCO)试剂盒说明书

RuBisCO Assay Kit

微量法

货号: AK281

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES39	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK281-A	25mL×1 瓶	4℃保存;
AK281-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存;
AK281-C	粉剂×2 瓶	-20℃保存; 临用前加入 500uL 蒸馏水充分溶解待用, 振荡溶解后若出现浑浊可以离心使用;
AK281-D	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 1ml 蒸馏水充分溶解待用
工作液配制:	临用前在 AK281-B 中加入全部 AK281-A, 充分混匀, 现配现用;	

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO, EC 4.1.1.39) 是一种酶, 分子量约为 53kD, 由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成, 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。

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 CO₂ 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, 伴随着 NADH 氧化生成 NAD⁺; 在 340 nm NADH 有特征吸收峰, 而 NAD⁺没有此吸收峰, 因此测定 340nm 吸光度下降速率可以代表 Rubisco 的羧化酶活性。

自备用品:

紫外分光光度计/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 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

粗酶液制备

- 按照组织质量 (g): 提取液 ES39 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES39), 进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 细菌或细胞样本的制备: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES39, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤

- 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 工作液在 25℃孵育 5min;
- 在微量石英比色皿或 96 孔板中依次加入下列试剂

试剂名称	测定管 (μL)	空白管 (μL)
样本	20	
蒸馏水		20
AK281-C	7	7
AK281-D	7	7

工作液	180	180
混匀；记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定= $A1$ 测定- $A2$ 测定， ΔA 空白= $A1$ 空白- $A2$ 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白（空白管只做 1-2 次）。		

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℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{RuBisCO 活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 344 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：25℃中每 g 组织每分钟氧化 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco 活力(U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 344 \times \Delta A \div W$$

3. 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：25℃中每 1 万个细菌或细胞每分钟氧化 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.69 \times \Delta A$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2.14×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，5 min； W ：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万； 10^9 ：单位换算系数，1mol= 10^9 nmol
 ※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

b. 使用 96 孔板（UV 板）测定的计算公式如下：

将上述公式中光径 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.5\text{cm}$ （96 孔板光径）进行计算。