北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）试剂盒

分光光度法 50 管/48 样

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_2 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：

（1）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_2 结合，产生 2 分子的 3-磷酸甘油酸（PGA）；

（2）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^+；

（3）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。

需自备的仪器和用品：

可见-紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液一：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

提取液二：液体 50mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 25mL **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 25mL **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 2.5 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

（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 1mL 石英比色皿中加入 50uL 样本、50uL 试剂四和 900uL 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ΔA=A1-A2。

Rubisco 活性计算：

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义：25℃中 1 mg 蛋白 1 min 氧化 1 n mol NADH。

Rubisco（nmol/min /mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T =643×ΔA÷Cpr

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 1 g 组织 1 min 氧化 1 nmol NADH。

Rubisco（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样÷V 样总×W) ÷T=643×ΔA÷W

上述计算公式中各符合含义：

V 反总：反应体系总体积，1×10^{-3} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5 min；W：样本质量，g。

