

植物二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-GH004-48 微板法 48 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 50mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底； 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后保存，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 0.55mL 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 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前加 1ml 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 48 个样本的初始活性检测或者 48 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（ 10^4 ）：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 48 个样本减少为 24 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 10 μL 增至 30 μL ，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 10 μL 减至 5 μL ，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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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, 6.22×10^3 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。

