

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCO)试剂盒说明书

RuBisCO Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK280

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES39	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK280-A	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK280-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存;
AK280-C	粉剂×2 瓶	-20℃保存; 临用前取 1 支加入 1 mL 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;
AK280-D	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 临用前加入 2mL 蒸馏水充分溶解待用;
工作液配制:	临用前在 AK280-B 中加入 50mL AK280-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、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。

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, 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

- 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零;
- 工作液在 25℃ (其它物种) 孵育 5min;
- 按下表依次加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (μL)	空白管 (μL)
样本	100	
蒸馏水		100
AK280-C	35	35
AK280-D	35	35
工作液	900	900

混匀；记录 340nm 处 20 s 时吸光值 A1 和 5 min 20 s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定= A_1 测定- A_2 测定， ΔA 空白= A_1 空白- A_2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白（空白管只做 1-2 次）。

RuBisCO 活性计算：

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. 按照样本鲜重计算：

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

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

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 1 nmol 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 反总：反应体系总体积， 1.07×10^{-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，0.1 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；500：细胞或细菌总数，500 万； 10^9 ：单位换算系数 $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。