二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（Rubisco）试剂盒说明书

（货号：PB1027F24　分光法　24 样）

有效期：3 个月

测定意义：

核酮糖-1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶（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：

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），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：

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：25mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：25mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 1ml'双蒸水充分溶解待用；

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 1ml 双蒸水充分溶解待用；

粗酶液制备：

1、组织：称取约 0.1g 组织加入 1mL 提取液，冰浴中匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌细胞：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）；10000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

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：临用前在试剂二中加入 22.5mL 试剂一，充分混匀，在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。

（2）在 1mL 石英比色皿中加入 30uL 样本、35uL 试剂三、35uL 试剂四和 900uL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 2min20s 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 活力（U/mg prot）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(Cpr×V 样) ÷T =2680×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 活力（U/g 鲜重）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样÷V 样总×W) ÷T=2680×ΔA÷W

电话：400-669-2220　13437835247（微信同号）
官网：http://www.perseebio.com.cn
地址：北京市大兴区黄村镇观音寺南里海北路 1 号

3、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：25℃中 1 万个细菌或细胞 1 min 氧化 1 nmol NADH。

Rubisco 活力（U/10^4 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样÷V 样总×500) ÷T=5.36×ΔA

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 mol/L/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；W：样品质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。