

二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)试剂盒说明书

(货号: PB1027W96 微量法 96 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:

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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 100mL×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、分光光度计或酶标仪预热 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 11.25mL 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 6uL 样本、7uL 试剂三、7uL 试剂四和 180uL 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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 1 mg 蛋白 1 min 氧化 1 n mol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 2680 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Rubisco 活力 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 2680 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌、细胞个数计算

单位的定义：25℃中 10⁴ 个细菌、细胞 1 min 氧化 1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ = 5.36 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义：

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.006 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。

b.使用 96 孔板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 1 mg 蛋白 1 min 氧化 1 n mol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 5360 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{Rubisco 活力 (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 5360 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌、细胞个数计算

单位的定义：25℃中 10⁴ 个细菌、细胞 1 min 氧化 1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ = 10.72 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义：

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ mol/L/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.006mL；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。