



1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)试剂盒说明书(精简版)

(货号: A151-1-1 分光光度法 25管/24样)

一、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 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。

二、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 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,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 氧化速率可反映 Rubisco 的活性。

三、自备的仪器和用品:

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

四、试剂的组成和配制:(试剂盒有效期 3 个月)

提取液一:液体 25mL×1 瓶,4℃ 保存;

提取液二:液体 25mL×1 瓶,4℃ 保存;

试剂一:30mL×1 瓶,4℃ 保存;

试剂二:粉剂×1 瓶,-20℃ 保存,临用前加入 12.5mL 试剂一,充分混匀备用,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 12.5mL 试剂一,充分混匀备用,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 1.25mL 试剂一,充分混匀备用,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。)

五、样本的前处理:

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 组织,加入 1mL 提取液一),冰浴匀浆后于 4℃,200g 离心 5min,分离并保留沉淀,取上清在 4℃,8000g 下离心 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和叶绿体中的 Rubisco,则按照步骤 2 提取粗酶液。(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。)

六、测定步骤

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预实验

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 50μL 样本、50μL 试剂四和 900μL 工作液,立即混匀,记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2,计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、Rubisco 活性计算:

1、**按照样本蛋白浓度计算**(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 法蛋白浓度测定试剂盒)

单位的定义:25℃ 中 1mg 蛋白 1min 氧化 1nmolNADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2、**按样本鲜重计算**

单位的定义:25℃ 中 1g 组织 1min 氧化 1nmolNADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ = 643 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义:

$V_{\text{反应}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积 1mL;

T : 反应时间, 5min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。