

二磷酸核酮糖羧化酶 (Rubisco) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

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:

提取液一: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

提取液二: 液体 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; 临用前加入 10mL 试剂一, 充分混匀待用; 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 10mL 试剂一, 充分混匀待用; 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 mL 试剂一, 充分溶解待用; 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。)

粗酶液制备:

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 酶的分离: 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 样本, 加入 1mL 提取液一), 冰浴匀浆后于 4℃, 200g 离心 5min, 弃沉淀, 取上清在 4℃, 8000g 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。)

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：临用前将试剂二和试剂三 1: 1 混合，用多少配多少；
 - (2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10uL 样本、10uL 试剂四和 180uL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 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 nmol NADH。

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

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 1nmol NADH。

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

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， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 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。

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 nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 1nmol NADH。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

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， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；W：样本质量，g。