上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

# 二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性检测试剂盒 微板法

**货号：**R32677

**规格：**48T

**保存温度：**-20℃保存，有效期 3 个月。

**产品简介：**

核酮糖-1,5-二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco, EC4.1.1.39）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，初始活性可反映体内酶的活化状态，总活性为体内已活化的酶加上潜在活化的酶活性。

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），在 3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的共同作用下，产生甘油醛-3-磷酸，并使还原型辅酶 I（NADH）氧化。因此，通过检测 340nm 下 NADH 的下降速率，即可得出 Rubisco 的酶活性大小，为了使 NADH 的氧化和 CO2 的固定同步。本试剂盒加入了 ATP 再生系统。

**产品组成：**

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|---|---|---|---|
| 提取液 | 液体 50mL×1 瓶 | 2-8℃保存 | |
| 试剂一 | 粉末×2 支 | -20℃保存 | 用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支分别加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后保存，禁止反复冻融，三天内用完。 |
| 试剂二 | 液体×1 支 | -20℃保存 | 用前甩几下或离心使试剂落入底部，再分别加 0.55mL 蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后保存，禁止反复冻融。 |
| 试剂三 | 粉末×1 支 | 2-8℃保存 | |
| 试剂四 | 液体 10mL×1 瓶 | 2-8℃保存 | |
| 试剂五 | 液体 1mL×1 支 | -20℃保存 | 一次性用不完可分装保存于-20℃。 |

**使用方法：**

建议正式实验前，选取 2 个样本做预测定，了解实验样品情况，熟悉流程，避免样本和试剂浪费！

一、样本准备

1. 组织样本：

(a) 称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆；

(b) 12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若样本颜色较深（如植物叶片），可引起起始值 A1 值较大如超过 1.5，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约 0.2g 组织（水分充足的样本可取 1g），加入 1mL 的 80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复 2 次。最后向离心得到的沉淀中加入 1mL 提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

2. 细菌/细胞样本：

(a) 先收集细菌（自养型）到离心管内，离心后弃上清；

(b) 取 $5\times10^{6}$ 个细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌（冰浴，功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；

(c) 12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按每 0.5~1×10 7 个细菌数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。

二、样品测定

1. 酶标仪预热 30min，设定波长到 340nm。

2. 提示：一般以检测初始活性为主。若检测总活性则该试剂盒从可以检测 48 个样本减少为 24 个样本。

3. 所有试剂解冻至室温（25℃），在 96 孔板中依次加入：

| 试剂名称 (μL) | 初始活性测定管 | 总活性测定管 |
|---|---|---|
| 样本 | 10 | 10 |
| 试剂一 | 20 | 20 |

| | | |
|---|---|---|
| 试剂二 | 10 | 10 |
| 试剂三 | 10 | 10 |
| 试剂四 | 130 | 130 |
| 试剂五 | 20 | 混匀，25℃孵育 15min |
| | | 20 |
| 轻轻混匀，室温（25℃) 条件下，于 340nm 处检测，10s（待反应 体系稳定）时读取 A1 ，10min 后读取 A2 ， ΔA=A1-A2。 | | |

【注】：1.初始活性测定管，加完试剂五后立即按照操作说明书检测；总活性测定管于 25℃孵育 10min 后再加试剂五，再按照操作说明书检测；

2.若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 再读值。

3.若△A 的值在零附近，可适当延长反应时间 T（如由 10min 延长到 20min 后读 A2），或增加样本加样量 V1(由 10μL 增至 30μL），则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

4.若 A1 值太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可适当减少样本加样量 V1(由 10μL 减至 5μL），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。

5.若ΔA 值大于 0.4，则需减少反应时间 T（如减至 5min），则改变后 T 需代入公式重新计算。

6.若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

三、结果计算

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol/min/mgprot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×$10^9$]÷(V1×Cpr)÷T=643.1×ΔA÷Cpr

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1nmol CO2 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol CO2/min/mgprot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10 9]÷(V1×Cpr)÷2÷T=321.6×ΔA÷Cpr

2. 按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织在每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10 9]÷(W×V1÷V)÷T=643.1×ΔA÷W

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1nmol CO2 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol CO2/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10 9]÷(W×V1÷V)÷2÷T=321.6×ΔA÷W

3. 按细菌数量计算：

单位定义：每 10 4 个细菌每分钟内氧化 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

Rubisco 活力(nmol/min/10 4cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10 9]÷(500×V1÷V)÷T=643.1×ΔA÷500

V--提取液体积，1mL

V1--加入样本体积，0.01mL

d--光径，0.5cm

V2--反应体系总体积，$2\times10^{-4}$L

ε--NADH 摩尔消光系数，$6.22\times10^{3}$L/mol/cm

W--样本质量，g

2--每固定 1nmolCO2 有 2nmolNADH 被氧化

T--反应时间，10min

500--细菌数量，万

Cpr--蛋白浓度（mg/mL）

**注意事项：**

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。