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/加氧酶(RuBisCO)活性检测试剂盒(可见分光法)

货号： R41930

规格： 50T/48S

有效期：6个月

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液ES39	50mL×1瓶	2-8℃保存；
试剂-A	50mL×1瓶	2-8℃保存；
试剂-B	粉剂×1瓶	-20℃保存；
试剂-C	粉剂×2瓶	-20℃保存；临用前取1支加入1mL蒸馏水充分溶解待用， 振荡溶解后若出现浑浊可以离心使用；
试剂-D	粉剂×1瓶	-20℃保存；临用前加入2mL蒸馏水充分溶解待用；
工作液配制：	临用前在试剂-B中加入50mL试剂-A,充分混匀，现配现用；	

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义：核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶（Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase，RuBisCO, EC 4.1.1.39）是一种酶，分子量约为 53kD，由 8 个大亚基和 8 个小亚基组成，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。

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，伴随着 NADH 氧化生成 NAD+；在 340 nm NADH 有特征吸收峰，而 NAD+没有此吸收峰，因此测定 340nm 吸光度下降速率可以代表 Rubisco 的羧化酶活性。

自备用品：

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。

粗酶液提取：

1. 按照组织质量（g）：提取液 ES39 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 ES39），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2. 细菌或细胞样本的制备：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g4℃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. 工作液在 25℃（其它物种）孵育 5min；

3. 按下表依次加入下列试剂

试剂名称	测定管(μL)	空白管(μL)
样本	100	
蒸馏水		100
试剂-C	35	35
试剂-D	35	35
工作液	900	900
混匀；记录340nm处20 s时吸光值A1和5min 20 s时的吸光值A2,计算△A测定=A1测定-A2测定，△A空白=A1空白-A2空白，△A=△A测定-△A空白(空白管只 做1-2次)。		

RuBisCO活性计算：

1. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：25℃中每毫克蛋白每分钟氧化 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

RuBisCO 活力 (U/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T = 344×ΔA÷Cpr

2. 按照样本鲜重计算：

单位的定义：25℃中每 g 组织每分钟氧化 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

RuBisCO 活力 (U/g 鲜重) = [ΔA×V 反总 ÷(ε×d)×10^9]÷(V 样÷V 样总×W)÷T =344×ΔA÷W

3. 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：25℃中每 1 万个细菌或细胞每分钟氧化 1 nmol NADH 为一个酶活力单位。

Rubisco 活力（U/104 cell）=[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样÷V 样总×500) ÷T=0.69×ΔA

注：V 反总：反应体系总体积，1.07×10^{-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 样：加入样本体积，0.1 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；500：细胞或细菌总数，500 万；10^9：单位换算系数 1mol=10^9nmol。