

Rubisco Activity Assay Kit

二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性检测试剂盒 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL1075A	二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性检测试剂盒 分光法	48T

产品简介:

核酮糖-1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco, 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,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	4℃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 0.75mL 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 2.1mL 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	4℃保存	
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 2mL×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:

- 称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆;
- 10000-12000g, 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,10000-12000g, 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, 10000-12000g, 4℃离心 10min,取上清置冰上待测。。

2. 细菌/细胞样本:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
 注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。



- 先收集细菌（自养型）到离心管内，离心后弃上清；
 - 取 5×10^6 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）；
 - 10000-12000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 【注】：若增加样本量，可按每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。

二、样品测定：

- 紫外分光光度计预热 30min，设定波长到 340nm，蒸馏水调零。
- 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。
- 所有试剂解冻至室温（25℃），在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）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	30	30
试剂一	40	40
试剂二	40	40
试剂三	40	40
试剂四	500	500
试剂五	40	混匀，25℃孵育 15min
		40
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 A1，10 min 后读取 A2，ΔA=A1-A2。		

- 【注】：
- 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；
 - 若 10s 后反应体系未稳定可延长到 1min 再读值。
 - 若 ΔA 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 30μL 增至 60μL），则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。
 - 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 30μL 减至 10μL），则改变后的 V1 需代入公式重新计算。
 - 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。
 - 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

- 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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 369.8 \times \Delta A \div Cpr$$

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

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol CO}_2/\text{min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div 2 \div T$$

$$= 184.9 \times \Delta A \div Cpr$$

- 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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 369.8 \times \Delta A \div W$$

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

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol CO}_2/\text{min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div 2 \div T$$

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



$$=184.9 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{Rubisco 活力}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 369.8 \times \Delta A \div 500\end{aligned}$$

V--提取液体积, 1 mL

d--光径, 1cm

ϵ --NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$

2--每固定 1 nmol CO_2 有 2 nmol NADH 被氧化

500--细菌数量, 万

V1--加入样本体积, 0.03mL

V2--反应体系总体积, $6.9 \times 10^{-4} \text{ L}$

W--样本质量, g

T--反应时间, 10min

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。

有效期:

-20°C保存三个月。

