

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（Rubisco）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHB9-M48	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 试剂盒	48T	微量法
PMHB9-M96		96T	

产品说明：

1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶（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。

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。

试剂组成：

试剂名称	规格（48T）	规格（96T）	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	液体 25 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×2 支	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	液体 13 mL×1 瓶	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	液体 2.5 mL×1 瓶	粉剂×1 支	-20℃保存

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、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）；10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、称取约0.1g组织加入1mL提取液，冰浴中匀浆。10000g，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。建议选取新鲜的植物样本。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、按下表步骤加样：

试剂名称	测定管	空白管
样本 (μL)	20	-
蒸馏水 (μL)	-	20
试剂三 (μL)	7	7
试剂四 (μL)	7	7
工作液 (μL)	180	180

记录340nm处20s时吸光值A1和5min20s时的吸光值A2，计算 $\Delta A_{测定} = A1_{测定} - A2_{测定}$ ， $\Delta A_{空白} = A1_{空白} - A2_{空白}$ ， $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。反应温度保持在25℃。
(空白管只做1-2管)

三、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℃中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco活力 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{pr} \times V_{样}) \div T = 344 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2. 按样本质量计算

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

$$\text{Rubisco活力 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T = 344 \times \Delta A \div W$$

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1nmol

NADH为一个酶活力单位。Rubisco活力 (U/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{样总} \times 500) \div T = 0.69 \times \Delta A$

$$\text{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{样总} \times 500) \div T = 0.69 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积，2.14×10⁻⁴L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.02mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

b.使用96孔板测定的计算公式如下：

将上述公式中光径d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算。