

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)试剂盒

比色法：25 管/24 样

一、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 氧化速率可反映 Rubisco 的活性。

二、自备的仪器和用品：

可见-紫外分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1ml 石英比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

三、试剂的组成和配制：

提取液一：液体 25ml×1 瓶，4℃保存；

提取液二：液体 25ml×1 瓶，4℃保存；

试剂一：30ml×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃保存，临用前加入 12.5ml 试剂一，充分混匀备用，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 12.5ml 试剂一，充分混匀备用，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 1.25ml 试剂一，充分混匀备用，用不完的试剂

分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

四、样本的前处理：

粗酶液提取详见试剂盒内说明书。测定组织、细菌和细胞时需要测定蛋白浓度。可用总蛋白定量测试盒(BCA法)进行蛋白浓度的测定。

五、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、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; 在 1ml 石英比色皿中, 加入 50ul 样本、50ul 试剂四和 900ul 工作液, 立即混匀, 记录 Δ 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2, 计算 $A=A1-A2$ 。

六、Rubisco 活性计算:

1、按照样本蛋白浓度计算

单位定义: 25℃中 1mg 蛋白 1min 氧化 1nmolNADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 法蛋白浓度测定试剂盒。

2、按样本鲜重计算

单位定义: 25℃中 1g 组织 1min 氧化 1nmolNADH 为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-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, 0.05mL; V 样总: 加入提取液体积 1mL; T: 反应时间, 5min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g。