

Rubisco Activity Assay Kit

二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性检测试剂盒 微板法

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 |
|---------|-------------------------------|-----|
| BL1074B | 二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)活性检测试剂盒 微板法 | 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°C保存 | |
| 试剂一 | 粉末×2 支 | -20°C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°C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 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 液体 10mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂五 | 液体 1mL×1 支 | -20°C保存 | 一次性用不完可分装保存于-20°C。 |

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) 10000-12000g, 4°C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°C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°C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。



- (a) 先收集细菌（自养型）到离心管内，离心后弃上清；
 - (b) 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）；
 - (c) 10000-12000g，4°C 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：

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°C），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°C 孵育 15min |
| | | 20 |
| 轻轻混匀，室温（25°C）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， $\Delta A = A1 - A2$ 。 | | |

- 【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°C 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 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 $10\mu\text{L}$ 增至 $30\mu\text{L}$ ），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 $10\mu\text{L}$ 减至 $5\mu\text{L}$ ），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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 643.1 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1 nmol CO_2 定义为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol CO}_2/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div 2 \div T = 321.6 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

单位定义：每毫克组织蛋白在每分钟内固定 1 nmol CO_2 定义为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol CO}_2/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div 2 \div T = 321.6 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{Rubisco 活力}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div 500$$

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。



V--提取液体积, 1 mL

d--光径, 0.5cm

ϵ --NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/ mol/cm

2--每固定 1 nmol CO₂ 有 2 nmolNADH 被氧化

500--细菌数量, 万

V1--加入样本体积, 0.01mL

V2--反应体系总体积, 2×10^{-4} 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。

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。

