

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性检测试剂盒

微量法

产品货号: BA1092

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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340nm 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。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体25mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	粉剂×2支	-20℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂三: 临用前取1支加入0.5mL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;
2. 试剂四: 临用前加入1mL蒸馏水充分溶解待用;
3. 工作液的配制: 临用前在试剂二中加入全部试剂一, 充分混匀, 在25℃孵育5min。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

二、测定操作表:

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 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$, $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。反应温度保持在25°C (空白管只做1-2管)。

二、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°C中每毫克蛋白每分钟氧化1nmol NADH为一个酶活力单位。

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

2. 按样本质量计算

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

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

3. 按细菌或细胞数量计算

单位的定义: 25°C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。

$$\text{Rubisco活力 (U/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.69 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.14×10^{-4} 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, 0.02mL; 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; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com