

二磷酸核酮糖羧化酶（Rubisco）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1245

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：植物组织

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，其活性直接影响着光合速率。本试剂盒提供了一种简单的检测方法，用于检测植物组织样本的 Rubisco 的活性，其原理是在 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液一	50mL	100mL	4℃ 保存
提取液二	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	12.5mL	25mL	4℃ 保存
试剂二	1	1	-20℃ 避光保存
试剂三	1	1	-20℃ 避光保存
试剂四	1	1	-20℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
制冰机、低温离心机
去离子水
匀浆器

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

提取液二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：临用前配制，对于 48T，加 5mL 试剂一溶解；对于 96T，加 10mL 试剂一溶解，混匀备用。用不完的试剂-20℃ 避光分装保存，避免反复冻融。

试剂三：临用前配制，对于 48T，加 5mL 试剂一溶解；对于 96T，加 10mL 试剂一溶解，混匀备用。用不完的试剂-20℃ 避光分装保存，避免反复冻融。

试剂四：临用前配制，对于 48T，加 0.5mL 试剂一溶解；对于 96T，加 1mL 试剂一溶解，混匀备用。用不完的试剂-20℃ 避光分装保存，避免反复冻融。

产品说明书

工作液：临用前将溶解后的试剂二和溶解后的试剂三按 1: 1 混合，根据实验需求配制相应的体积。

样本制备

粗酶液制备：

1. 总 Rubisco 酶提取：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆，超声波破碎 1min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s），8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。
2. 胞浆和叶绿体 Rubisco 酶的分离：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液一，冰浴匀浆，200g，4℃离心 5 min，弃沉淀，取上清在 8,000 g，4℃离心 10min，离心后取上清用于测定胞浆 Rubisco 酶活性，取沉淀加 1mL 提取液二，震荡溶解后超声破碎 1min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s），8,000g，4℃离心 10min，取上清测定叶绿体中 Rubisco 酶活性。

注意：推荐使用新鲜样本，以保证酶的活力。建议测定总 Rubisco 酶活性，按照步骤 1 提取粗酶液，若需要分别测定胞浆和叶绿体中的 Rubisco，则按照步骤 2 提取粗酶液。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
2. 操作表（下述操作在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中操作）：

	空白孔（ μL ）	测定孔（ μL ）
样本	0	10
去离子水	10	0
试剂四	10	10
工作液	180	180

3. 迅速混匀后于 340nm 检测，记录 20s 和 5min 20s 的吸光值，测定孔的记为 A_1 和 A_2 ，空白孔的记为 A_3 和 A_4 ，计算 $\Delta A_{\text{测}} = (A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)$ 。

注意：空白孔只需测定 1 次。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。

结果计算

A. 使用 96 孔 UV 微孔板测定的计算公式

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：25℃中，每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (U/mg prot)} = [\Delta A_{\text{测}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A_{\text{测}} \div \text{Cpr}$$

（2）按样本质量计算：

单位的定义：25℃中，每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 氧化定义为一个酶活力单位。

$$\text{Rubisco (U/g 质量)} = [\Delta A_{\text{测}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1286 \times \Delta A_{\text{测}} \div W$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积，0.2mL = 2×10^{-4} L， $V_{\text{提取}}$ ：提取液体积，1mL； $V_{\text{样本}}$ ：反应体系中上清液体积，0.01mL； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：96 孔板直径，0.5cm；Cpr：蛋白浓度（mg/mL）；T：反应时间，5min；W：样本质量，g。

B. 使用微量石英比色皿进行测定的计算公式

将上述计算公式中光径 d ：0.5cm 调整为 d ：1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：



产品说明书

PMK0999 辅酶 I NAD(H) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1000 NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1004 NADH 氧化酶 (NOX) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号: