

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶（Rubisco）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0440

规格：25T/24S、50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	25T 规格	50T 规格	保存条件
提取液	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 瓶	-20℃保存

25T 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（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
- 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。

50T 溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前取 1 支加入 1 mL 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（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）；
- 2、试剂四：临用前加入 2 mL 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。

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL石英比色皿、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 200W，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. 紫外分光光度计预热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）	100	-
蒸馏水（μL）	-	100
试剂三（μL）	35	35
试剂四（μL）	35	35
工作液（μL）	900	900

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℃（空白管只做 1-2 管）。

三、Rubisco 活性计算

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1 nmol 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℃中每 g 组织每分钟氧化1 nmol 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℃中每1万个细菌或细胞每分钟氧化1 nmol 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，1.07×10⁻³L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：1mL石英比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.1mL；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。

实验实例：

1、取 0.1g 植物叶片，加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.279 - 1.206 = 0.073$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.834 - 0.823 = 0.011$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.073 - 0.011 = 0.062$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{Rubisco 活力 (U/g 质量)} = 344 \times \Delta A \div W = 344 \times 0.062 \div 0.1 = 213.28 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献：



- [1] Li J, Zhao C, Li C, Xue B, Wang S, Zhang X, Yang X, Shen Z, Bo L, He X, Qiu Z, Wang J. Multidrug-resistant plasmid RP4 increases NO and N₂O yields via the electron transport system in *Nitrosomonas europaea* ammonia oxidation. *Water Res.* 2023 Aug 15; 242:120266. doi: 10.1016/j.watres.2023.120266. Epub 2023 Jul 2. PMID: 37421866.
- [2] An J, Fang C, Yuan Z, Hu Q, Huang W, Li H, Ma R, Wang L, Su T, Li S, Wang L, Duan Y, Wang Y, Zhang C, Xu R, Zhang D, Cao Y, Hou J, Kong F, Sun L. A retrotransposon insertion in the Mao1 promoter results in erect pubescence and higher yield in soybean. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Mar 28; 120(13): e2210791120. doi: 10.1073/pnas.2210791120. Epub 2023 Mar 22. PMID: 36947519; PMCID: PMC10068782.
- [3] Hou Z, Zhou Q, Xie Y, Mo F, Kang W, Wang Q. Potential contribution of *Chlorella vulgaris* to carbon-nitrogen turnover in freshwater ecosystems after a great sandstorm event. *Environ Res.* 2023 Oct 1; 234:116569. doi: 10.1016/j.envres.2023.116569. Epub 2023 Jul 7. PMID: 37422116.
- [4] Gao P, Guo L, Gao M, Zhao Y, Jin C, She Z. Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *J Environ Manage.* 2022 Jan 15; 302(Pt B):114095. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114095. Epub 2021 Nov 12. PMID: 34775333.
- [5] Zhao W, Yang XQ, Zhang QS, Tan Y, Liu Z, Ma MY, Wang MX, Xu B. Photoinactivation of the oxygen-evolving complex regulates the photosynthetic strategy of the seagrass *Zostera marina*. *J Photochem Photobiol B.* 2021 Sep; 222:112259. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2021.112259. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34274827.

参考文献:

- [1] E RINTAMÄKI, E-M ARO. Photosynthetic and Photorespiratory Enzymes in Widely Divergent Plant Species with Special Reference to the Moss *Ceratodon purpureus*: Properties of Ribulose Biphosphate Carboxylase/Oxygenase, Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Glycolate Oxidase [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1985, 36(11): 1677-1684.
- [2] Lan Y, Woodrow IE, Mott KA. Light-dependent changes in ribulose biphosphate carboxylase activase activity in leaves [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(1): 304-309.
- [3] Pearce FG, Andrews TJ. The relationship between side reactions and slow inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase revealed by a loop 6 mutant of the tobacco enzyme [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(35): 32526-32536.

相关系列产品:

- BC0310/BC0315 辅酶I NAD(H)含量检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒
- BC1130/BC1135 NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒

