

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC0445

规格：100T/96S

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

溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 0.5 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 1 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340 nm 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/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UV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 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、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）

三、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，2.14×10⁻⁴L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

b. 使用 96 孔 UV 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 UV 板光径）进行计算。

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，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定管}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 1.2647 - 1.1825 = 0.0822$ ， $\Delta A_{\text{空白管}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 0.8649 - 0.8502 = 0.0147$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定管}} - \Delta A_{\text{空白管}} = 0.0822 - 0.0147 = 0.0675$ ，按样本质量计算酶活得：
Rubisco 活力 (U/g 质量) = 344×ΔA÷W=344×0.0675÷0.1=232.2 U/g 质量。

相关发表文献：

[1] Li Q, Jiang YL, Xia LY, Chen Y, Zhou CZ. Structural insights into cyanobacterial RuBisCO assembly coordinated by two chaperones Raf1 and RbcX. Cell Discov. 2022 Sep 20;8(1):93. doi: 10.1038/s41421-022-00436-9. PMID: 36123352; PMCID: PMC9485235.



- [2] Han T, Han X, Ye X, Xi Y, Zhang Y, Guan H. Applying mixotrophy strategy to enhance biomass production and nutrient recovery of *Chlorella pyrenoidosa* from biogas slurry: An assessment of the mixotrophic synergistic effect. *Bioresour Technol.* 2022 Dec;366:128185. doi: 10.1016/j.biortech.2022.128185. Epub 2022 Oct 25. PMID: 36307028.
- [3] Wang Y, Wang J, Gu Z, Yang S, He Y, Mou H, Sun H. Altering autotrophic carbon metabolism of *Nitzschia closterium* to mixotrophic mode for high-value product improvement. *Bioresour Technol.* 2023 Mar;371:128596. doi: 10.1016/j.biortech.2023.128596. Epub 2023 Jan 10. PMID: 36638896.
- [4] Zhang Y, Tian X, Huang P, Yu X, Xiang Q, Zhang L, Gao X, Chen Q, Gu Y. Biochemical and transcriptomic responses of buckwheat to polyethylene microplastics. *Sci Total Environ.* 2023 Nov 15;899:165587. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165587. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37467981.
- [5] Zhang Z, Guo L, Liao Q, Gao M, Zhao Y, Jin C, She Z, Wang G. Bacterial-algal coupling system for high strength mariculture wastewater treatment: Effect of temperature on nutrient recovery and microalgae cultivation. *Bioresour Technol.* 2021 Oct;338:125574. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125574. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34303141.

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 Bisphosphate 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 bisphosphate 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

