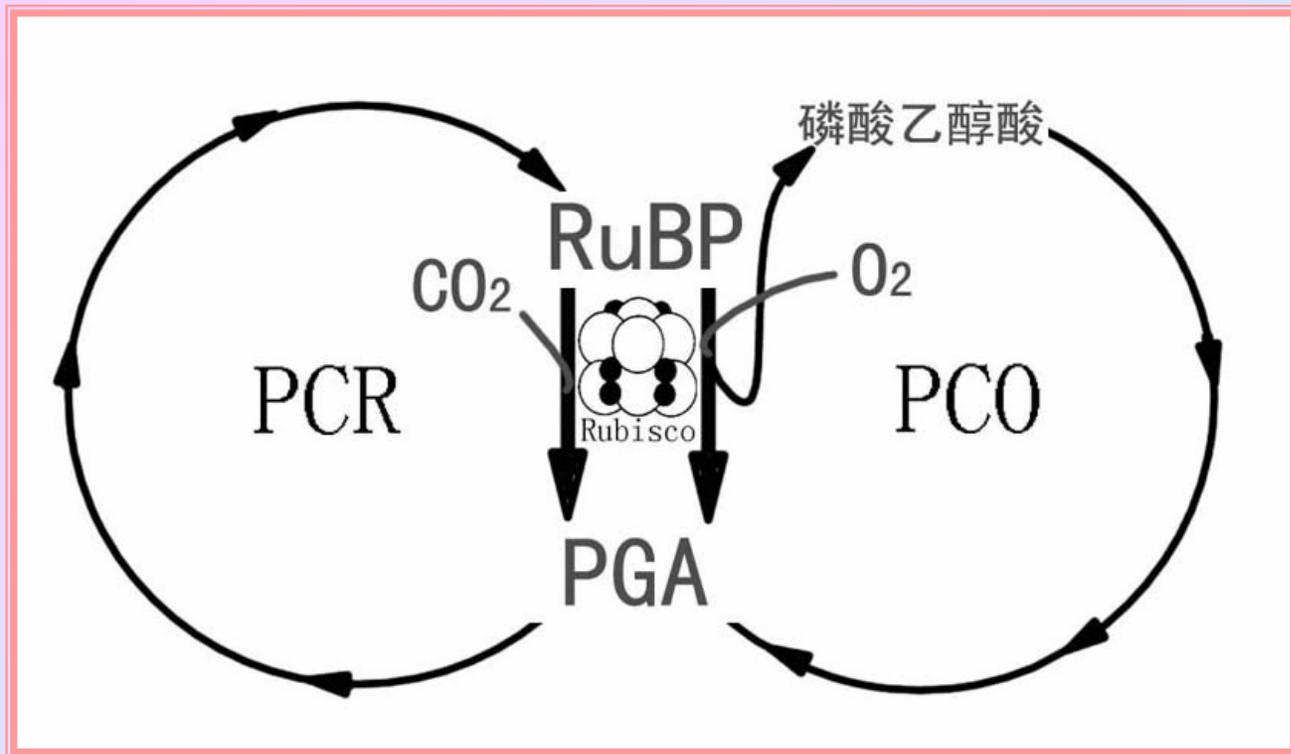


Rubisco定量技术

——免疫扩散法

Rubisco（核酮糖-1，5-二磷酸羧化酶/加氧酶）是光合碳代谢中的关键酶，一方面催化光合作用中 CO_2 固定的第一步反应，同时又催化光呼吸过程的第一步反应，调节着光合作用和光呼吸的代谢比例，对光合速率起着决定性作用。其含量常作为光合生理生化指标。



（一）实验原理

当琼脂胶上交联有某一蛋白（抗原）的抗血清（抗体）时，只有该抗原才能与抗体形成沉淀线，而一定范围内形成沉淀线的圆面积与抗原量成正比。当把其它蛋白冲洗干净后，用考马斯亮蓝**R25**染色，则可测出沉淀线包围的圆面积，依此再利用标准样品可计算待测样品中该蛋白的含量。

(二) 方法步骤

1. Rubisco 的提取

取鲜叶**0.100g**（如果计算单位面积酶活力则应测出叶面积）加液N₂固定，并迅速磨成粉状，加**1%**不溶性**PVP**和**1ml~2ml Rubisco**抽提液，磨成均浆，在**15 000g**高速离心**15min**，上清液即为酶粗提液，整个过程应在**0℃~4℃**下进行。

2. 制胶

根据样品多少计算胶用量（长×宽×厚），制作浓度为1%的琼脂胶。加热溶解后先用1%的热琼脂液把塑料框固定在玻璃上，把内框多余琼脂用水真空泵吸去。

待琼脂胶刚好冷却到55℃时加入适量抗血清（抗血清用量为4μl/ml琼脂胶），迅速混匀后倒入塑料框内，待胶凝固后打孔。

•3. 打孔点样

- 用微打孔器 ($\Phi < 2\text{mm}$) 按 $1.1\text{cm} \times 1.1\text{cm}$ 孔距均匀打孔, 并用水真空泵吸去孔中琼脂胶, 然后分别在每个孔中注入标样和Rubisco粗提液 $2\mu\text{l}$, 重复4次以上。将胶板放入装有用水吸饱的数层滤纸搪瓷盘中, 加盖置于 25°C 恒温箱中48h。

- **4. 染色脱色测定**

- 取出胶板并浸入含0.9%NaCl的塑料盘中轻轻搅拌30min，以去除其它杂蛋白，再用蒸馏水冲洗数次后去掉塑料框架。胶上覆3层滤纸及20层~30层吸水面巾纸，上压约1kg重量书一本，30min后去除书及纸，用电热吹风机均匀吹干胶至透明，再浸入染色液中染至蓝色（约10min~20min），取出后用蒸馏水冲洗数次，浸入脱色液中脱色，直至留下清晰的沉淀圆而其它部分无色，再用电热吹风机吹干。
- 分别测出标样和待测样品圆面积，用标样浓度和面积制作标准曲线，并根据待测样品面积，计算样品Rubisco含量。

- 5、结果计算
- Rubisco含量的计算公式如下：

$$\text{Rubisco含量} = \text{标准曲线查得的} \times \frac{\text{提取样品总体积(ml)}}{\text{取样叶片鲜重(g)}}$$

(mg/g.FW) (mg/ml)

图1 免疫扩散法测定酶含量示意图

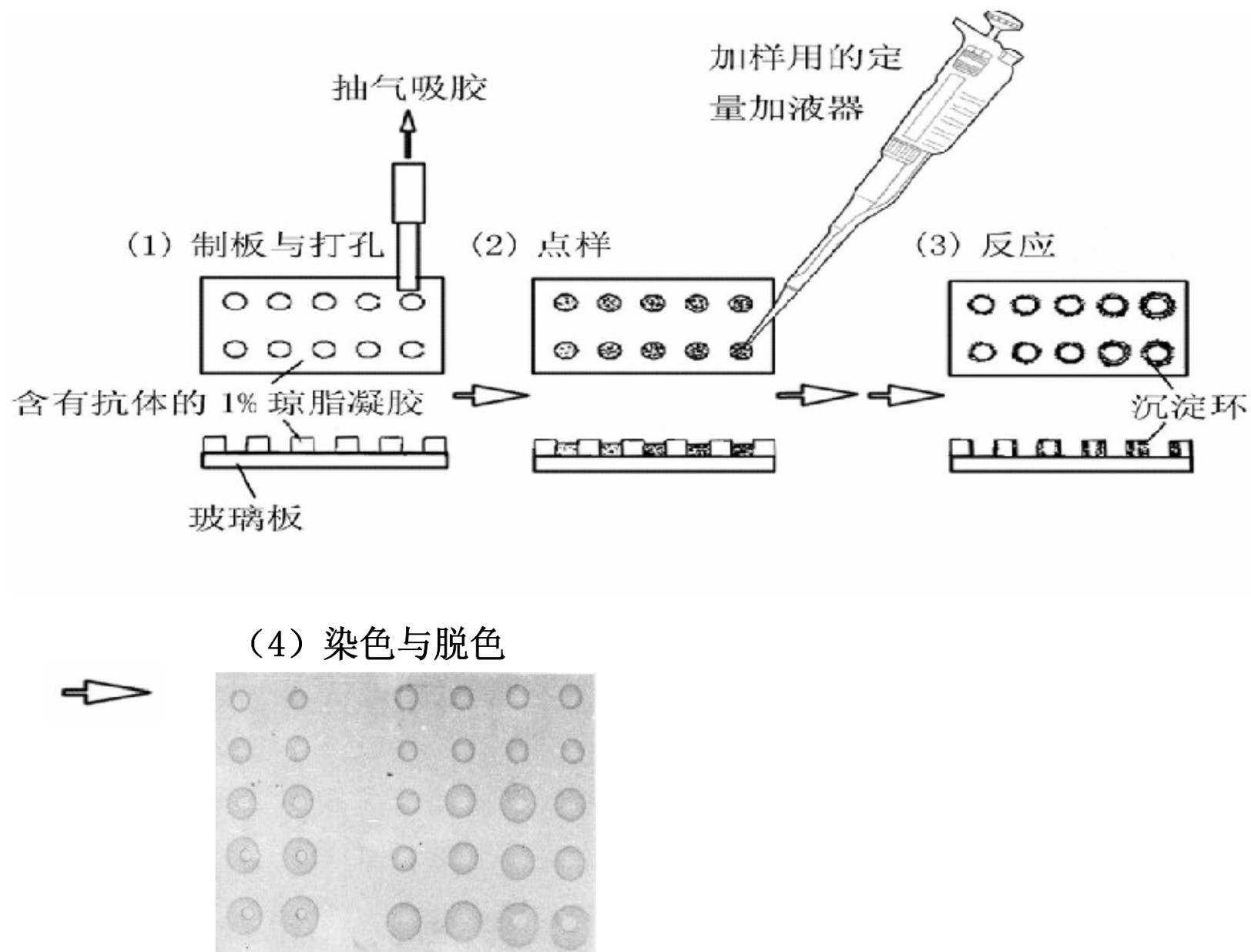
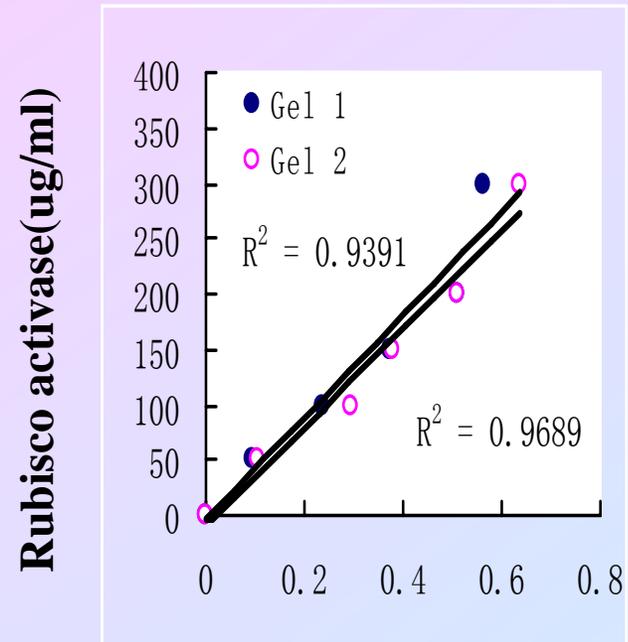
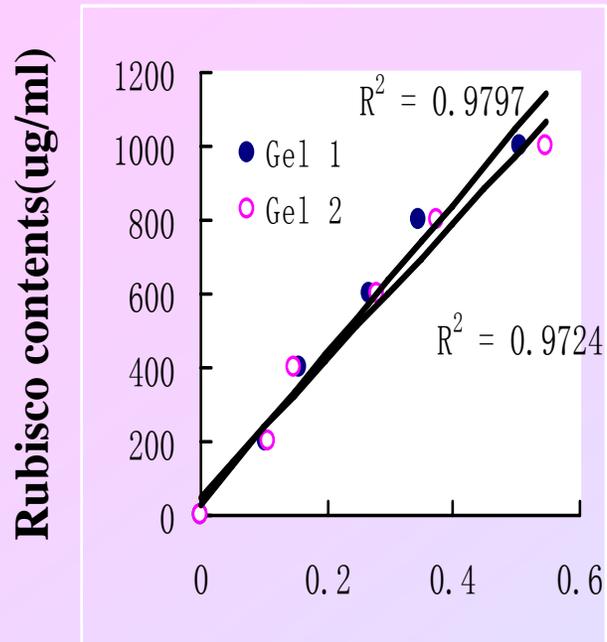


表 1 Rubisco 和 Rubisco 活化酶的免疫扩散沉淀圈面积和含量关系的统计分析

Rubisco 含量 contents (mg/ml)	1 号胶 沉淀圈面积 Gel 1 Precipitation areas(cm ²)	2 号胶 沉淀圈面积 Gel 2 Precipitation areas(cm ²)	Rubisco 活化酶含量 Activase content (mg/ml)	1 号胶 沉淀圈面积 Gel 1 Precipitation areas(cm ²)	2 号胶 沉淀圈面积 Gel 2 Precipitation areas(cm ²)
0	0	0	0	0	0
200	0.104±0.006	0.108±0.008	50	0.096±0.004	0.106±0.017
400	0.155±0.006	0.148±0.003	100	0.236±0.015	0.294±0.008
600	0.267±0.006	0.279±0.021	150	0.374±0.026	0.379±0.011
800	0.346±0.027	0.372±0.015	200	0.512±0.044	0.512±0.044
1000	0.506±0.013	0.546±0.037	300	0.561±0.030	0.636±0.032



Precipitation zone areas (cm²)

图2免疫扩散法测Rubisco和Rubisco活化酶的沉淀圈面积和含量的关系。