滤纸酶（Filter paper Activity，FPA）试剂盒说明书

（货号：G0555W 微板法 48 样）

一、产品简介：

纤维素酶是由微生物产生的多组分的酶系，能水解纤维素β-1,4 葡萄糖苷键生成葡萄糖，研究滤纸酶活力对纤维素酶的研究具有非常重要的意义。

滤纸酶水解滤纸产生的还原糖能与 3,5-二硝基水杨酸生成红棕色氨基化合物，在 540nm 处有最大光吸收，在一定范围内反应液颜色深浅与还原糖的量成正比，可测定计算得滤纸酶的活力。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
	滤纸条×100 根	4℃保存	
试剂一	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、研钵、低温离心机、恒温水浴锅、可调式移液器。

四、滤纸酶（FPA）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：取约 0.1g 组织（水分充足的样本可取 0.5g），加入 1mL 蒸馏水，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水，超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；4℃×12000rpm 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照数量（10^4）：提取液体积(mL)为 500-1000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：若是澄清液体，直接检测，若液体样本浑浊，需 4℃×12000rpm，离心 10min，取上清液检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

③ 煮沸样本的制备：可取至少 300μL 待检测样本上清液于 95-100℃煮沸 10min 后，于室温或 4℃×12000rpm 离心 10min，上清液即为对照管的待检液。

④ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	100	100（煮沸样本）
滤纸条	1 根	1 根
试剂一	800	800
50℃孵育 60min		
试剂二	400	400
混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温		
蒸馏水	400	400

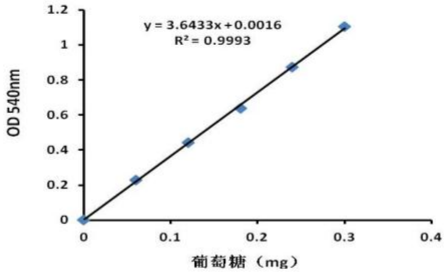
混匀，取出 200μL 待检液至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个样本做一个样本自身对照）。

【注】1.若 A 测定值超过 1.5，可适当对样本进行稀释再检测，或者取 200μL 至 96 孔板前先进行稀释（如吸取 100μL 待检液+100μL 蒸馏水，相当于稀释 2 倍）,则相应的稀释倍数 D 需代入计算公式计算。

2. 若ΔA 小于 0.01，可增加样本体积 V1（如增至 200μL，则蒸馏水相应减少，保持总体积不变）或延长反应时间 T（如增至 2h）或增加取样质量 W，则改变后的 V1 和 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为：y = 3.6433x + 0.0016，x 是标准品质量（mg），y 是ΔA。



2、按照蛋白浓度计算：

定义：50℃下，每毫克蛋白每小时分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

FPA(mg/h/mg prot)=[(ΔA-0.0016)÷3.6433]÷(V1×Cpr)÷T×D=2.74×(ΔA-0.0016)÷Cpr×D

3、按照样本质量计算：

定义：50℃下，每克组织每小时分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活单位。

FPA(mg/h/g)=[(ΔA-0.0016)÷3.6433]÷(W×V1÷V)÷T×D=2.74×(ΔA-0.0016)÷W×D

4、按液体体积计算：

定义：50℃下，每毫升液体每小时分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

FPA(mg/h/mL)=[(ΔA-0.0016)÷3.6433]÷V1÷T×D=2.74×(ΔA-0.0016)×D

5、按细胞数量计算：

定义：50℃下，每 10^4 个细胞每小时分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需酶量为一酶活力单位。

FPA(mg/h/10^4cell)=[(ΔA-0.0016)÷3.6433]÷(V1×细胞数量÷V)÷T×D

=2.74×(ΔA-0.0016)÷细胞数量×D

V---提取液体积，1mL； V1---反应体系中加入样本体积，0.1mL；

W---样本质量，g； T---反应时间，60min=1 小时； D---稀释倍数，未稀释即为 1；

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（5mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。

2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3 100μL 标准品+800μL 试剂一+400μL 试剂二，混匀，沸水浴（95-100℃）5min，冷却至室温，再加 400μL 蒸馏水，混匀后取出 200μL 待检液至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。