

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°C保存	
试剂一	液体 80mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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°C×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°C×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°C×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°C)。

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

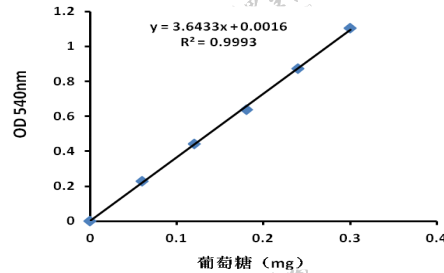
④ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μ L)	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°C 孵育 60min		
试剂二	400	400
混匀,沸水浴(95-100°C) 5min,冷却至室温		
蒸馏水	400	400

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

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 $^{\circ}$ C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。

$$FPA(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0016) \div 3.6433] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D = 2.74 \times (\Delta A - 0.0016) \div Cpr \times D$$

3、按照样本质量计算：

定义：50 $^{\circ}$ C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。

$$FPA(\text{mg/h/g}) = [(\Delta A - 0.0016) \div 3.6433] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 2.74 \times (\Delta A - 0.0016) \div W \times D$$

4、按液体体积计算：

定义：50 $^{\circ}$ C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。

$$FPA(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A - 0.0016) \div 3.6433] \div V1 \div T \times D = 2.74 \times (\Delta A - 0.0016) \times D$$

5、按细胞数量计算：

定义：50 $^{\circ}$ C下，每 10⁴ 个细胞每小时分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

$$FPA(\text{mg/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A - 0.0016) \div 3.6433] \div (V1 \times \text{细胞数量} \div V) \div T \times D \\ = 2.74 \times (\Delta A - 0.0016) \div \text{细胞数量} \times D$$

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 $^{\circ}$ C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。
- 3 100 μ L 标准品+800 μ L 试剂一+400 μ L 试剂二，混匀，沸水浴（95-100 $^{\circ}$ C）5min，冷却至室温，再加 400 μ L 蒸馏水，混匀后取出 200 μ L 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。