

滤纸酶 (Filter paper Activity, FPA) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TDX024 分光法 24 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 \times 50 根	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂一	液体 40mL \times 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
试剂二	液体 25mL \times 1 瓶	4 $^{\circ}$ C 保存	
标准品	粉体 1 支	4 $^{\circ}$ C 保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 $^{\circ}$ C \times 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 $^{\circ}$ C \times 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 $^{\circ}$ C \times 12000rpm,离心 10min,取上清液检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 540nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂至常温 (25 $^{\circ}$ C) 状态。

③ 每个样本需一个自身对照即煮沸样本:样本于 95-100 $^{\circ}$ C 水浴锅中煮沸 10min 即可。

④ 在 EP 管中依次加入:

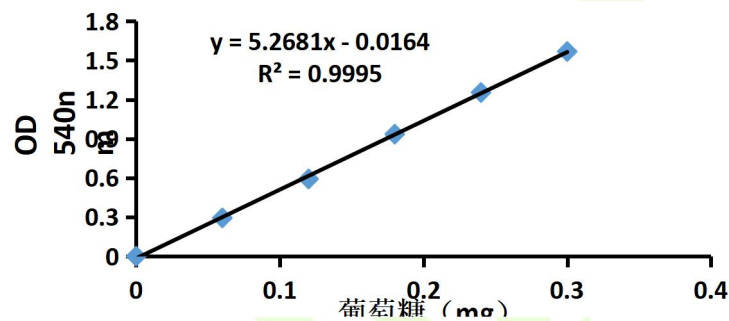
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	100	100 (煮沸样本)
滤纸条	1 根	1 根
试剂一	800	800
50 $^{\circ}$ C 孵育 60min		
试剂二	400	400

混匀，沸水浴 (95-100°C) 5min, 冷却至室温		
蒸馏水	400	400
混匀，取出 800μL 待检液至 1mL 玻璃比色皿中，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 差值接近零, 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: $y = 5.2681x - 0.0164$, x 是标准品质量 (mg), y 是ΔA。



2、按照蛋白浓度计算

定义: 50°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。

$$FPA(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 5.2681] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D = 1.9 \times (\Delta A + 0.0164) \div Cpr \times D$$

3、按照样本质量计算

定义: 50°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。

$$FPA(\text{mg/h/g}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 5.2681] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 1.9 \times (\Delta A + 0.0164) \div W \times D$$

4、按液体体积计算

定义: 50°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。

$$FPA(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 5.2681] \div V1 \div T \times D = 1.9 \times (\Delta A + 0.0164) \times D$$

5、按细胞数量计算

定义: 50°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。

$$FPA(\text{mg/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0164) \div 5.2681] \div (V1 \times \text{细胞数量} \div V) \div T \times D \\ = 1.9 \times (\Delta A + 0.0164) \div \text{细胞数量} \times D$$

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°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、100μL 标准品+800μL 试剂一+400μL 试剂二, 混匀, 沸水浴 (95-100°C) 5min, 冷却至室温, 再加 400μL 蒸馏水, 混匀后取出 800μL 待检液至 1mL 玻璃比色皿中, 于 540nm 处读取吸光值 A。根据结果即可制作标准曲线。