

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

(货号: ADS-W-TDX024 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
	滤纸条 100 根	4℃ 保存	
试剂一	液体 80mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂二	液体 50mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、滤纸酶 (FPA) 活性测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 所有试剂至常温 (25℃) 状态。

③ 每个样本需一个自身对照即煮沸样本: 样本于 95-100℃ 水浴锅中煮沸 10min 即可。

④ 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μ L)	测定管	对照管
样本	100	100 (煮沸样本)
滤纸条	1 根	1 根

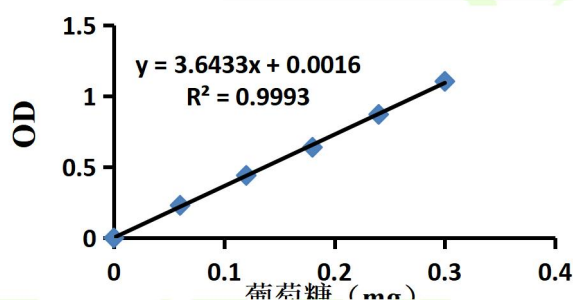
试剂一	800	800
50°C孵育 60min		
试剂二	400	400
混匀，沸水浴（95-100°C）5min，冷却至室温		
蒸馏水	400	400
混匀，取出 200μL 待检液至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个样本自身对照）。		

【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： $y = 3.6433x + 0.0016$ ，x 是标准品质量（mg），y 是 ΔA 。



2、按照蛋白浓度计算

定义：50°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。

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

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。

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

4、按液体体积计算

定义：50°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。

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

5、按细胞数量计算

定义：50°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力单位。

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

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。

- 3 100 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。

