

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

(货号: BP10281F 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

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°C保存	
试剂一	液体 40mL $\times$ 1 瓶	4°C避光保存	
试剂二	液体 25mL $\times$ 1 瓶	4°C避光保存	
标准品	粉体 1 支	4°C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、所需的仪器和用品:

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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 $\times$ 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°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°C $\times$ 12000rpm, 离心 10min, 取上清液检测。

2、上机检测:

① 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°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°C 水浴锅中煮沸 10min 即可。

④ 在 EP 管中依次加入:

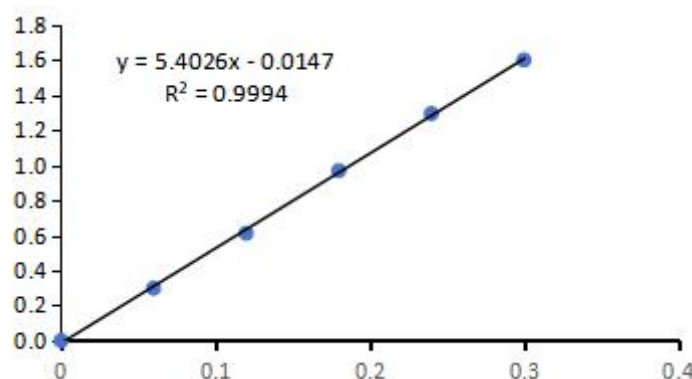
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	100	100 (煮沸样本)

滤纸条	1 根	1 根
试剂一	800	800
50°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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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： $y = 5.4026x - 0.0147$ ，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。

$$\text{FPA}(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0147) \div 5.4026] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 1.85 \times (\Delta A + 0.0147) \div \text{Cpr} \times D$$

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。

$$\text{FPA}(\text{mg/h/g}) = [(\Delta A + 0.0147) \div 5.4026] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 1.85 \times (\Delta A + 0.0147) \div W \times D$$

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。

$$\text{FPA}(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0147) \div 5.4026] \div V1 \div T \times D = 1.85 \times (\Delta A + 0.0147) \times D$$

5、按细胞数量计算

定义：50°C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个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{FPA}(\text{mg/h}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0147) \div 5.4026] \div (V1 \times \text{细胞数量} \div V) \div T \times D \\ &= 1.85 \times (\Delta A + 0.0147) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

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 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），标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 600uL，加入 400uL 蒸馏水，混匀得到 3mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水		100
试剂一	800	800
试剂二	400	400
混匀，沸水浴 (95-100℃) 5min，冷却至室温		
蒸馏水	400	400
混匀后取出 800μL 待检液至 1mL 玻璃比色皿中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		