

滤纸酶（Filter paper Activity, FPA）试剂盒说明书

（货号：BP10281W 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、指标测定：

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：

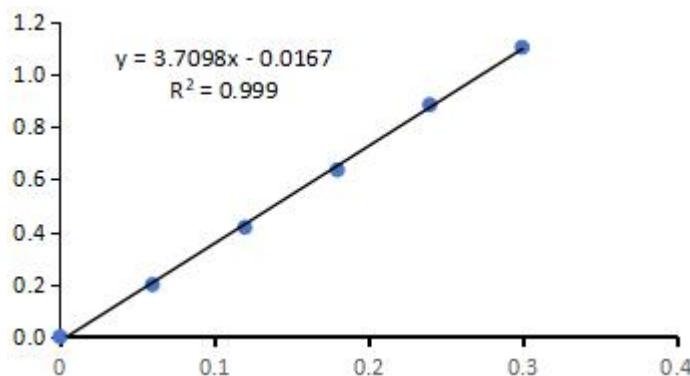
试剂组分（ μ L）	测定管	对照管
样本	100	100（煮沸样本）
滤纸条	1 根	1 根

试剂一	800	800
50℃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， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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： $y = 3.7098x - 0.0167$ ，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。

$$FPA(\text{mg/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0167) \div 3.7098] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D = 2.7 \times (\Delta A + 0.0167) \div Cpr \times D$$

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。

$$FPA(\text{mg/h/g}) = [(\Delta A + 0.0167) \div 3.7098] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 2.7 \times (\Delta A + 0.0167) \div W \times D$$

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。

$$FPA(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0167) \div 3.7098] \div V1 \div T \times D = 2.7 \times (\Delta A + 0.0167) \times D$$

5、按细胞数量计算

定义：50℃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。

$$FPA(\text{mg/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0167) \div 3.7098] \div (V1 \times \text{细胞数量} \div V) \div T \times D \\ = 2.7 \times (\Delta A + 0.0167) \div \text{细胞数量} \times D$$

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 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°C) 5min，冷却至室温		
蒸馏水	400	400
混匀后取出 200μL 待检液至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		