

滤纸酶（FPA）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号: AC10481

规格: 50T/24S

产品内容: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 35 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 60 mL×1 瓶	4°C保存
滤纸条	50 mg×50 条	常温保存
标准品	粉剂×1 瓶	4°C保存

溶液的配制:

1. 滤纸条: 常温防潮保存。
2. 标准品: 临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解, 配成 10 mg/mL 葡萄糖溶液备用, 4°C可保存一周。

产品说明:

纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖一类酶的总称, 它不是单体酶, 而是起协同作用的多组分酶系。以不溶性纤维素如滤纸为底物测定的纤维素酶称为滤纸酶, 研究滤纸酶活力对纤维素酶总体酶活力的研究的有着重要意义。

FPA 水解滤纸产生还原糖, 还原糖与 3,5 -二硝基水杨酸反应生成在 540 nm 有特征吸收峰的棕红色物质, 通过测定 540 nm 处吸光值变化可计算得 FPA 活性。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计、台式低温离心机、水浴锅、1 mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水、EP 管 (2 mL)。

操作步骤:**一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)**

1. 组织: 按照质量 (g) : 蒸馏水体积(mL)为 1 : 5~10 的比例 (建议称取约 0.1 g, 加入 1 mL 蒸馏水) 加入蒸馏水, 冰浴匀浆后于 4°C, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。
2. 细胞或细菌: 先收集细胞或细菌到离心管中, 离心后弃上清; 按照细胞或细菌数量 (10^4 个) : 蒸馏水体积 (mL) 为 500~1000 : 1 的比例 (建议 500 万细胞或细菌加入 1 mL 蒸馏水), 冰浴超声波破碎细胞或细菌 (功率 300 w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3 min); 然后 4°C, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。
3. 培养液或其它液体: 直接检测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长至 540 nm, 蒸馏水调零。
- 2、将 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 0.8、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2 mg/mL 的标准溶液备用。
- 3、取 200 μ L 样本沸水浴 10 min (盖紧, 防止水分散失), 放置常温后作为对照管。

4、操作表：(在 2 mL 离心管中操作，其中对照管与测定管用有滤纸的 EP 管，空白管与标准管无需滤纸)

试剂名称 (μL)	对照管	测定管	标准管	空白管
煮沸样本	200	-	-	-
样本	-	200	-	-
每支 Ep 管中放入一个卷状滤纸条 (注意要放入底部)，作为底物。			-	-
标准溶液	-	-	200	-
蒸馏水	-	-	-	200
试剂一	500	500	500	500
混匀，50°C 水浴锅中准确反应 30 min			-	-
试剂二	800	800	800	800
混匀，沸水浴 5 min (盖紧，防止水分散失)，取出后立即冷却至室温，测定 540nm 处吸光值 A，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。每个测定管需设一个对照管，标准曲线只需检测 1-2 次。				

三、FPA 活性计算

1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x (mg/mL)。

2、FPA 活性的计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 蛋白每分钟分解滤纸产生 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{FPA 酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{提取}} \div (V_{\text{提取}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.0333x \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每 g 样品每分钟分解滤纸产生 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{FPA 酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 0.0333x \div W$$

(3) 按照细胞或细菌数量计算

酶活定义：每 10^4 个细胞每分钟分解滤纸产生 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{FPA 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{提取}} \div \text{细胞数量 (万个)} \div T = 0.0333x \div \text{细胞数量 (万个)}$$

(4) 按液体体积计算

酶活定义：每 mL 样本每分钟分解滤纸产生 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位。

$$\text{FPA 酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.0333x$$

V 提取：提取液 (蒸馏水) 体积，1 mL；V 样：加入的样本体积，0.2 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；T：反应时间，30 min。

注意事项：

1. 用干净的镊子取出滤纸条，带手套将滤纸条卷成小卷放入 Ep 管底部。
2. 当 A 或 ΔA 超过 1.2 时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定，计算公式中乘以稀释倍数。
3. 显色结束吸取检测液时注意枪头不要碰到滤纸条，以免带入毛状物，影响测定结果。

实验实例：

- 1、取 0.1g 平菇伞部加入 1mL 蒸馏水，冰浴匀浆后于 4℃，12000 rpm 离心 10 min，取上清置于冰上待测。之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.668 - 0.425 = 0.243$ ，带入标准曲线 $y = 1.6716x - 0.2189$ ，计算 $x = 0.2763$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{FPA 酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{提取}} \div W \div T = 0.0333x \div W = 0.092 \text{ U/g 质量。}$$