

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0799

Size: 50T/24S

滤纸酶 (FPA) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

天平、研钵、低温离心机、可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
滤纸条	50mg×50 条	-	

五、酶液提取

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 0.1g, 加入 1mL 蒸馏水) 加入蒸馏水, 冰浴匀浆后于 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量 (10^4 个) : 蒸馏水体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 培养液或其它液体：直接检测。

六、测定操作

1. 根据样本数量取两倍数量的滤纸条和 Ep 管, 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。
2. 对照管：取 200 μ L 灭活的酶液, 加入 500 μ L 试剂一, 充分混匀, 再加入放有滤纸条的 Ep 管中, 标注为对照管。
3. 测定管：取 200 μ L 酶液, 加入 500 μ L 试剂一, 充分混匀, 再加入放有滤纸条的 Ep 管中, 标注为测定管。
4. 对照管和测定管同时置于 50°C 水浴锅中反应 30min。
5. 加 800 μ L 试剂二, 沸水浴 5min, 自来水冷却后取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿中测定 540nm 处吸光值, 分别记为 A 对照管和 A 测定管。

七、酶活性计算公式

标准曲线: $y = 0.2805x - 0.0255$, $R^2 = 0.9991$

(1) 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 50°C, pH4.6 条件下, 每毫克蛋白每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 0.891 \times (\Delta A + 0.0255) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 50°C, pH4.6 条件下, 每克组织每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/g)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.891 \times (\Delta A + 0.0255) \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 50°C, pH4.6 条件下, 每毫升培养液每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{FPA (U/mL)} = (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 0.891 \times (\Delta A + 0.0255)$$

(4) 按细胞数量计算

酶活性定义: 在 50°C, pH4.6 条件下, 每 10^4 个细胞每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \\ &\div T = 0.891 \times (\Delta A + 0.0255) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 1.5mL, V 样: 反应体系中加入样本体积, 0.2mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min

八、注意事项

1. 用干净的镊子取出滤纸条，带手套卷成卷放入 Ep 管底部。
2. 样本灭活时保证同一批样本处理时间一致，建议沸水浴十分钟。
3. 批量样本测定之前先做 1-2 个样本的预实验，若吸光值超过 1.2，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。
4. 显色后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。