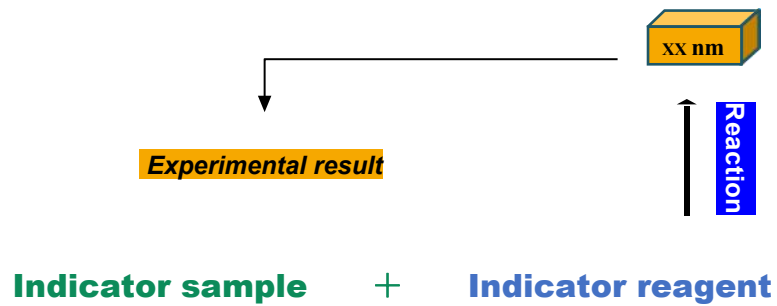


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

自备实验用品及仪器

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。

试剂组成和配制

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	-	-

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℃, 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℃, 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。

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℃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。

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。

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

(4) 按细胞数量计算

酶活性定义: 在50°C, pH4.6条件下, 每10⁴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

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。