



滤纸酶活性检测试剂盒

FPA Assay Kit

可见分光光度法

产品编号: AK400V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK400-A	25mL×1 瓶	4℃保存
AK400-B	40mL×1 瓶	4℃保存
滤纸条:	50mg×50 条	室温保存
AK400-标准品	粉剂×1 支	临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解, 配成 10 mg/mL 溶液备用; 4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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, 滤纸酶 (Filter paper activity, FPA) 可水解滤纸生成还原糖。滤纸酶活性可反映纤维素酶3种水解酶, 即外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和 β -葡聚糖苷酶组成的诱导复合酶系协同作用后的总酶活。研究滤纸酶活力对纤维素酶的研究具有非常重要的意义。

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。

自备用品:

可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿、天平、研钵、低温离心机、恒温水浴锅。

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 蒸馏水), 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。

测定步骤:

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. 将 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 2、1.6、1.2、0.8、0.5、0.2mg/mL 的标准溶液备用。
3. 按照表达操作:

试剂名称	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
灭活的酶液		200		
酶液	200			
AK400-A	500	500	500	500
充分混匀, 再分别加入放有滤纸条的 Ep 管中, 标注为对照管和测定管。				
	滤纸条	滤纸条		

标准溶液			200	
蒸馏水				200
对照管和测定管同时置于 50℃水浴锅中反应 30min。				
AK400-B	800	800	800	800
沸水浴 5min，自来水冷却后取 200μL 于微量石英比色皿/96 孔板中测定 540nm 处吸光值，分别记为 A 对照管、A 测定管、A 标准管、A 空白管。计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。每个测定管需设一个对照管，标准曲线和空白管只需检测 1-2 次。				

酶活性计算公式：

1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，mg/mL）和吸光度 $\Delta A_{标准}$ （y， $\Delta A_{标准}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$ （y， $\Delta A_{测定}$ ）带入公式计算样本浓度（x，mg/mL）。

2. 酶活性的计算

（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。

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

（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。

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

（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。

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

（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。

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

V 提取：提取液（蒸馏水）体积，1 mL；V 样：加入的样本体积，0.2mL；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。