



滤纸酶活性检测试剂盒

FPA Assay Kit

微量法

产品编号: AK400M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK400-A	30mL×1 瓶	4°C保存
AK400-B	50mL×1 瓶	4°C保存
滤纸条:	25mg×100 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°C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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、天平、研钵、低温离心机、恒温水浴锅、EP 管 (2ml)。

酶液提取

- 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。
- 细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 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°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
- 培养液或其它液体: 直接检测。

测定步骤:

- 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。
- 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。
- 灭活菌液: 取 250ul 样本沸水浴 10min(缠封口膜, 防止爆盖), 放置常温后作为对照管样本。
- 按照下表操作:

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
灭活的酶液		100		
酶液	100			
AK400-A	250	250	250	250
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			100	
蒸馏水				100

对照管和测定管同时置于 50℃ 水浴锅中反应 30min。				
AK400-B	400	400	400	400
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 ΔA 测定 = A 测定管 - A 对照管, ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管。				
注: 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 ΔA 标准 (y, ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定 (y, ΔA 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。

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

(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。

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

(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。

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

注: V 提取: 提取液 (蒸馏水) 体积, 1 mL; V 样: 加入的样本体积, 0.1 mL; C_{pr}: 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。