

使用说明书

Instruction Manual

滤纸酶活性检测试剂盒（可见分光光度法）

FPA Assay Kit (Visible Spectrophotometry)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0079V-A	35mL×1 瓶	4℃保存。
CB0079V-B	60mL×1 瓶	4℃保存。
滤纸条	50mg×50 条	室温保存。
CB0079V-Standard	粉剂×1 支	临用前加入 1mL 蒸馏水溶解，配成 10 mg/mL 溶液备用； 4℃保存。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、天平、研钵、低温离心机、恒温水浴锅。

二、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。

三、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		200		
酶液	200			
CB0079V-A	500	500	500	500
充分混匀，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。				
CB0079V-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 $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准管} - A_{空白管}$ 。

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。

四、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。

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

注：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。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

