

滤纸酶检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1194

保存：4℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：组织、细胞、细菌、真菌、培养液或其它液体

产品简介

纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖一类酶的总称，能水解纤维素 β -1, 4 葡萄糖苷键生成葡萄糖，它不是单体酶，而是起协同作用的多组分酶系。以不溶性纤维素如滤纸为底物测定的纤维素酶称为滤纸酶，研究滤纸酶活力对纤维素酶总体酶活力的研究有着重要意义。本试剂盒可检测各种生物样本中滤纸酶活性，其原理是滤纸酶水解滤纸产生的还原糖能与葱酮反应，在 620nm 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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	15mL	30mL	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
滤纸条	25mg×50 条	25mg×100 条	室温保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	4℃保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计（能测 620nm 处的吸光度）以及水浴锅
96 孔板或微量玻璃比色皿，可调节式移液枪及枪头
离心机、制冰机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂二：临用前 48T 加入 2.5mL 去离子水和 22.5mL 浓硫酸，96T 加入 5mL 去离子水和 45mL 浓硫酸，充分溶解待用；4℃避光保存。

滤纸条：即用型；常温保存。

标准品：含 10mg 无水葡萄糖，临用前加入 1mL 去离子水溶解。配制成 10mg/mL 标准溶液备用，4℃可保存 1 周，也可分装 -20℃ 长期保存。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mg/mL 标准溶液稀释为 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625mg/mL 的标准溶液。

	标准品体积	去离子水体积	浓度
Std. 1	40μL 10mg/mL	960μL	0.4mg/mL

产品说明书

Std. 2	400 μ L of Std. 1 (0.4mg/mL)	400 μ L	0.2mg/mL
Std. 3	400 μ L of Std. 2 (0.2mg/mL)	400 μ L	0.1mg/mL
Std. 4	400 μ L of Std. 3 (0.1mg/mL)	400 μ L	0.05mg/mL
Std. 5	400 μ L of Std. 4 (0.05mg/mL)	400 μ L	0.025mg/mL
Std. 6	400 μ L of Std. 5 (0.025mg/mL)	400 μ L	0.0125mg/mL
Std. 7	400 μ L of Std. 6 (0.0125mg/mL)	400 μ L	0.00625mg/mL

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 去离子水冰浴匀浆。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清置于冰上待测。

细菌或细胞：收集 5×10^6 个细菌或细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1mL 去离子水，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清置于冰上待测。

培养液或其它液体：直接检测。（若溶液有浑浊则离心后取上清进行测定）

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 620nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 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。
3. 取 100 μ L 样本沸水浴 10min（盖紧，防止水分蒸发），冷却至常温后作为对照管。
4. 操作表（在 EP 管中操作，其中对照管与测定管用有滤纸的 EP 管，空白管和标准管无需滤纸）：

	对照管	测定管	标准管	空白管
煮沸样本	100 μ L	-	-	-
样本	-	100 μ L	-	-
滤纸条	1 条	1 条	-	-
标准品	-	-	100 μ L	-
去离子水	-	-	-	100 μ L
试剂一	250 μ L	250 μ L	250 μ L	250 μ L
混匀，50℃水浴锅中准确反应 30min				
试剂二	260 μ L	260 μ L	260 μ L	260 μ L

混匀，90℃水浴 10min（盖紧，防止水分散失），冷却至室温后，取 200 μ L 转移至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，于 620nm 处分别读取空白管、标准管、对照管和测定管吸光值，计算 $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

注意：空白管和标准曲线只需测定 1 次，每个测定管设一个对照管。实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $A_{\text{测定}}$ 大于 2.0，需要将样本用提取液稀释，计算公式中乘以相应稀释倍数。由于浓硫酸具有强腐蚀性，请谨慎操作。

结果计算

1. 标准曲线的绘制：

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标准}}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入方程得到 y (mg/mL)。

2. 样本滤纸酶活性计算

1. 按样本质量计算：

单位的定义：在 50℃，pH4.6 条件下，每 g 组织在反应体系中每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 U。

产品说明书

滤纸酶活性(U/g 质量) $=y \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=0.117 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W$

2. 按细菌或细胞数量计算:

单位的定义: 在 50°C, pH4.6 条件下, 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 U。

滤纸酶活性 (U/10⁴cells) $=y \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T=0.000233 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$

3. 按液体样本体积计算:

单位的定义: 在 50°C, pH4.6 条件下, 每 mL 液体样本在反应体系中每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 U。

滤纸酶活性 (U/mL) $=y \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T=0.117 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$

4. 按蛋白浓度计算

在 50°C, pH4.6 条件下, 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟分解滤纸产生 1mg 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 U。

滤纸酶活性 (U/mg prot) $=y \times V_{\text{反应}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T=0.117 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div Cpr$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 0.35mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 样本总体积, 1mL; T: 反应时间, 30 min; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1182 纤维素酶 (CL) / 羧甲基纤维素酶检测试剂盒 (微量法)

PMK1164 葡萄糖检测试剂盒 (微量法)

PMK1181 还原糖检测试剂盒 (微量法)

PMK1184 α -葡萄糖苷酶 (α -GC) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1185 β -葡萄糖苷酶 (β -GC) / 纤维二糖水解酶检测试剂盒 (微量法)

PMK1193 糖化酶检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

