

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

微量法 100T/48S

**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  $\beta$ -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/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅。

**试剂组成和配制:**

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 $\mu$ L 灭活的酶液,加入 500 $\mu$ 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 $\mu$ L 酶液,加入 500 $\mu$ 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. 加入 800 $\mu$ L 试剂二,沸水浴 5min,自来水冷却后取 200 $\mu$ L 于微量石英比色皿/96 孔板中测定 540nm 处吸光值,分别记为 A 对照管和 A 测定管,  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

**酶活性计算公式：**
**a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

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℃， 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。

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

**(2) 按照样本质量计算**

**酶活性定义：**在 50℃， 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℃， 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℃， pH4.6 条件下， 每 10<sup>4</sup> 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

**b. 用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准曲线：  $y = 0.1403x - 0.0255$ ，  $R^2 = 0.9991$

**(1) 按照蛋白浓度计算**

**酶活性定义：**在 50℃， 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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.1403 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 1.782 \times (\Delta A + 0.0255) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

**(2) 按照样本质量计算**

**酶活性定义：**在 50℃， 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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/g)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.1403 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.782 \times (\Delta A + 0.0255) \div W \end{aligned}$$

**(3) 按液体体积计算**

**酶活性定义：**在 50℃， 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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/mL)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.1403 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 1.782 \times (\Delta A + 0.0255) \end{aligned}$$

## (4) 按细胞数量计算

**酶活性定义:** 在 50℃, pH4.6 条件下, 每 10<sup>4</sup> 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。

$$\text{FPA (U/10}^4\text{cell)} = (\Delta A + 0.0255) \div 0.1403 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.782 \times (\Delta A + 0.0255) \div \text{细胞数量 (万个)}$$

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。

