

## 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<sup>4</sup>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°C，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°C，pH4.6条件下，每104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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/104cell)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.891 \times (\Delta A + 0.0255) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

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<sup>2</sup> = 0.9991

(1) 按照蛋白浓度计算

**酶活性定义：**在50°C，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。

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

(2) 按照样本质量计算

**酶活性定义：**在50°C，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°C，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°C，pH4.6条件下，每104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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/104cell)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.1403 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 1.782 \times (\Delta A + 0.0255) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

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

#### 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。

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)