

滤纸酶（FPA）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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 β -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。

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：

- 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。
- 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。
- 培养液或其它液体：**直接检测。

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. 对照管：取 200 μ L 灭活的酶液，加入 500 μ 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 μ L 酶液，加入 500 μ 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 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 30min。
5. 加入 800 μ L 试剂二，沸水浴 5min，自来水冷却后取 200 μ 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， $\Delta A = A$ 测定管 - A 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 $^{\circ}$ 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。

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

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 50 $^{\circ}$ 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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/g)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.891 \times (\Delta A + 0.0255) \div W \end{aligned}$$

(3) 按液体体积计算

酶活性定义: 在 50 $^{\circ}$ 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℃，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。

$$\begin{aligned} \text{FPA (U/10}^4\text{cell)} &= (\Delta A + 0.0255) \div 0.2805 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.891 \times (\Delta A + 0.0255) \div \text{细胞数量 (万个)} \end{aligned}$$

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, R² = 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。

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

(2) 按照样本质量计算

酶活性定义：在 50℃，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 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。

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

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。