

# 植酸酶（phytase）试剂盒说明书

（微板法 48 样）

## 一、产品简介：

植酸酶（phytase，EC.3.1.3.8）是催化植酸及其盐类水解为肌醇与磷酸（盐）的一类酶的总称，属磷酸单酯水解酶，能将食品和饲料中植酸及其盐转化为可供有机体利用的有效磷，降低粪便中的磷含量，减轻对环境的污染，改善营养成分的吸收和利用，因此具有极其广泛的研究和应用价值。

植酸酶在一定温度和 pH 值条件下，水解底物植酸钠生成无机磷与肌醇衍生物，无机磷在酸性环境中与特异显色剂反应生成蓝色复合物，通过在 700nm 处检测该有色物质颜色的生成速率即可计算植酸酶活性大小。

## 二、试剂盒组成和配制：

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求 | 备注                                |
|------|-------------|------|-----------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                   |
| 试剂一  | 液体 30mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                   |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 瓶   | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,再加入 7mL 试剂一,充分溶解备用, |
| 试剂三  | 液体 8mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                   |
| 试剂四  | 粉剂 mg×1 瓶   | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,再加入 8mL 蒸馏水,充分溶解备用。 |
| 试剂五  | 粉剂 mg×1 支   | 4℃保存 | 临用前甩几下使试剂落入底部,再加入 2mL 蒸馏水,充分溶解备用。 |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支   | 4℃保存 | 若重新做标曲,则用到该试剂。                    |

反应 mix 的制备（现配现用）：试剂四：五按照 4:1 的比例混合，可根据样本数量配制需要量，若一次性用完，可把试剂五一次性全部倒入试剂四中，混合备用。

## 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、天平、低温离心机、恒温水浴锅，可调式移液器。

## 四、植酸酶活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

### 1、样本的制备：

- ① 组织样本：取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，4℃，12000rpm 离心 10min，取上清液待测。
- ② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

### 2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min，调节波长至 700nm。在 EP 管中依次加入：

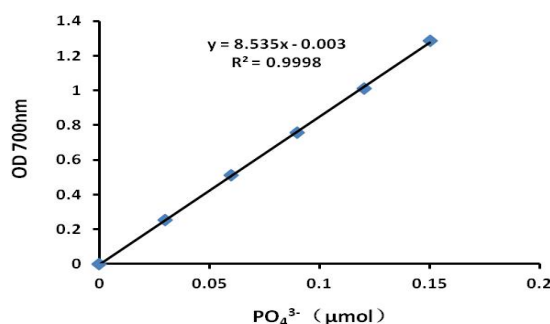
| 试剂名称（μL） | 测定管 | 对照管 |
|----------|-----|-----|
| 样本       | 30  | 30  |
| 试剂一      |     | 120 |

|                                                                                                              |     |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|
| 试剂二                                                                                                          | 120 |    |
| 37℃水浴锅或恒温培养箱孵育 30min                                                                                         |     |    |
| 试剂三                                                                                                          | 75  | 75 |
| 反应 mix                                                                                                       | 75  | 75 |
| 混匀，37℃静置 15min，若浑浊，需 12000rpm 室温离心 10min，取上清 200μL 至 96 孔板中，于 700nm 处检测， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。 |     |    |

【注】若 $\Delta A$  在零附近，可以延长 37℃温育时间（如 1 小时或更长），或者加大样本量（如 50μL，则试剂一或二相应减少），改变后的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 8.535x - 0.003$ ；x 为标准品质量（μmol），y 为吸光值 $\Delta A$ 。



2、按照蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每毫克蛋白每分钟释放 1μmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

植酸酶(μmol/min/mg prot)=( $\Delta A+0.003$ )÷8.535÷(Cpr×V1)÷T=0.13×( $\Delta A+0.003$ )÷Cpr

3、按照样本质量计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每克样本每分钟释放 1μmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

植酸酶(μmol/min/g 鲜重)=( $\Delta A+0.003$ )÷8.535÷(W×V1÷V)÷T=0.13×( $\Delta A+0.003$ )÷W

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每 10<sup>4</sup> 个细胞每分钟释放 1nmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

植酸酶(nmol/min/10<sup>4</sup> cell)=( $\Delta A+0.003$ )÷8.535×10<sup>3</sup>÷(500×V1÷V)÷T=130×( $\Delta A+0.003$ )÷500

5、按液体体积计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每毫升液体每分钟释放 1μmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

植酸酶(μmol/min/mL)=( $\Delta A+0.003$ )÷8.535÷V1÷T=0.13×( $\Delta A+0.003$ )

V ---提取液体积，1 mL；

V1 ---加入样本体积，30μL =0.03mL；

W----样本质量，g；

T----反应时间，30min。

Cpr---上清液蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（5μmol/mL）：标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5. μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。