

植酸酶（phytase）试剂盒说明

书

微量法100T/48S

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

植酸酶（phytase）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，它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。

测定原理

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钼酸铵显色剂反应生成蓝色复合物，在700nm处有特征吸收峰，根据700nm处吸光值变化可计算得植酸酶活性。

自备实验用品及仪器

天平、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，超声溶解器，回旋式振荡器。

试剂组成和配制

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

缓冲液：液体15mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：粉剂×1支，4℃保存，临用前加缓冲液6mL配制，现用现配；用不完的试剂4℃保存一个月。

试剂二：液体15mL×1瓶，4℃保存。

显色剂：粉剂×8瓶，4℃保存，临用前根据用量每瓶加0.4mL双蒸水溶解，再加1.6mL试剂二混匀。

样本处理

1. 酶制剂：按照质量（g）：提取液体积（mL）为1：500~1000的比例（建议称取约0.001g，加入1mL提取液）加入提取液，在超声波溶解器上溶解15min，再用回旋式振荡器振荡15min，待测。
2. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，在超声波溶解器上溶解15min，再用回旋式振荡器振荡15min，4℃，4000g离心10min，取上清待测。
3. 饲料样品：饲料烘干粉碎，过40目筛，按照质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液）进行冰浴匀浆，在超声波溶解器上溶解15min，再用回旋式振荡器振荡15min，4℃，4000g离心10min，取上清待测。
4. 培养液等液体样品，混匀直接测定。

测定操作表

	对照管	测定管
样本（ μL ）	30	30
37℃温育5min		
缓冲液（ μL ）	120	

试剂一 (μL)		120
混匀, 37°C温育30min		
95°C, 10min终止反应, 冷却至室温		
显色剂 (μL)	150	150
混匀, 37°C静置15min, 10000g, 室温, 离心5min, 取上清200μL, 测定700nm处吸光值, ΔA=A测定管-A对照管。每个测定管设一个对照管。		

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: $y = 0.2764x + 0.0082$, $R^2 = 0.9998$; x 为标准品浓度 (μmol/mL), y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在37°C, pH5.5的条件下, 每毫克蛋白每分钟从5mmol/L的植酸钠溶液中释放出1μmol的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 (μmol/min/mg prot) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div C_{pr} \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div C_{pr} \div T$. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在37°C, pH5.5的条件下, 每克样本每分钟从5mmol/L的植酸钠溶液中释放出1μmol的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 (μmol/min /g 鲜重) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div W \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div W \div T$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义: 在37°C, pH5.5的条件下, 每毫升液体每分钟从5mmol/L的植酸钠溶液中释放出1μmol的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 (μmol/min /mL) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div T$

C_{pr} : 样本蛋白含量, 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: $y = 0.1382x + 0.0082$, $R^2 = 0.9998$; x 为标准品浓度 (μmol/mL), y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在37°C, pH5.5的条件下, 每毫克蛋白每分钟从5mmol/L的植酸钠溶液中释放出1μmol的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 (μmol/min/mg prot) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div C_{pr} \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div C_{pr} \div T$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在37°C, pH5.5的条件下, 每克样本每分钟从5mmol/L的植酸钠溶液中释放出1μmol的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 (μmol/min /g 鲜重) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div W \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div W \div T$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义: 在37°C, pH5.5的条件下, 每毫升液体每分钟从5mmol/L的植酸钠溶液中释放出1μmol的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 (μmol/min /mL) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div T$

Cpr: 样本蛋白含量, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min。

注意事项

- 1、显色剂需要临用前根据用量配制, 每一瓶是13个样本的用量, 新配制的显色剂若有颜色则已经污染或者试剂过期, 应放弃使用。
- 2、 ΔA 线性范围为0.01-1。

www.affandi-e.com