

土壤植酸酶试剂盒说明书

(货号：ADS-W-TR054 微板法 48 样)

有效期：6 个月

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。

土壤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反应生成蓝色复合物, 通过在 700nm 处检测该有色物质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
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 28mL 试剂一, 充分溶解备用,
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 16mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
试剂五	粉剂 1 支	4°C保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 4mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂 1 支	4°C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、土壤植酸酶活性测定：

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

1、样本制备：

取新鲜土样风干或者 30°C 烘箱风干, 先粗研磨, 过 40 目筛备用。

【注】：土壤风干, 减少土壤中水分对于实验的干扰; 土壤过筛, 保证取样的均匀细腻;

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
土壤	0.1g	0.1g
试剂一		500
试剂二	500	
混匀，37°C振荡培养 1 小时		
试剂三	100	100
混匀，室温条件下 10000rpm，离心 5min。上清液待测。		

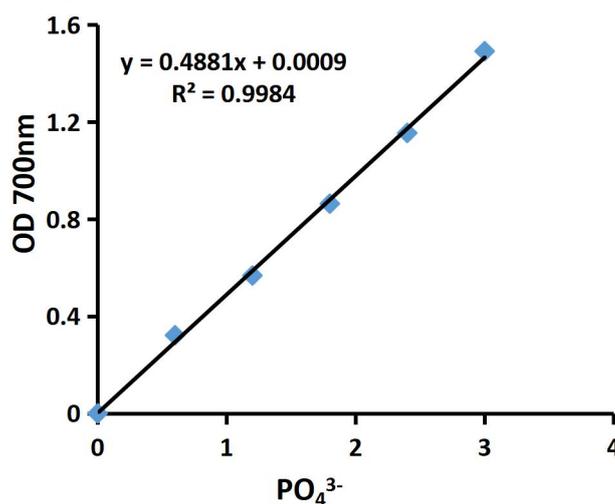
- ③ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

上清液	100	100
试剂三	50	50
反应 mix	150	150
混匀，室温 (25°C) 静置 15min，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

- 【注】 1. 若显色反应阶段静置后出现浑浊现象，静置结束后可先于室温 10000rpm，离心 5min 后，再取全部上清液至 96 孔板中，
2. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可在 37°C 孵育阶段延长反应时间 T (如增至 3h 或更长)，或增加土壤样本量 W (如增至 0.2g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.4881x + 0.0009$ ，x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 是 ΔA 。



- 2、酶活定义：37°C条件下，pH5.5 的条件下，每克土样每小时释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤植酸酶活性}(\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0009) \div 0.4881 \times V1 \div W \div T \\ &= 1.23 \times (\Delta A - 0.0009) \div W \end{aligned}$$

V1---孵育阶段的反应总体积, 0.6mL; T---反应时间, 1h; W---样本质量, g;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5 μ mol/mL): 标准品用 10mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。

