

土壤植酸酶 (phytase) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-TR059 分光法 24 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 30mL 试剂一, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 28mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 24mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 6mL 试剂三, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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、样本提取:

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、检测步骤：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 700nm，蒸馏水调零。
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
土壤	0.2g	0.2g
试剂一		1000
试剂二	1000	
混匀，37°C振荡培养 1 小时		
试剂三	200	200
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：

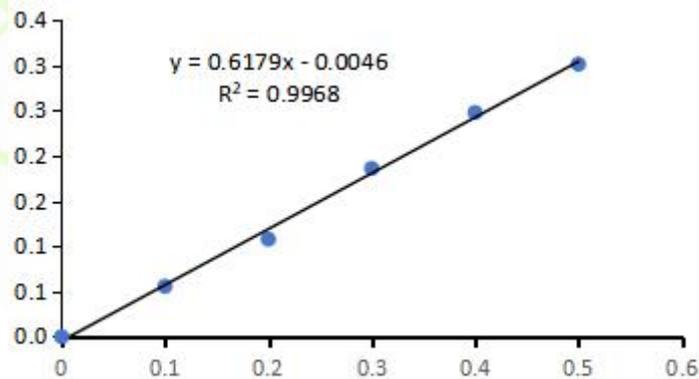
上清液	300	300
试剂三	150	150
反应 mix	450	450
混匀，室温 (25°C) 静置 15min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A - A_{-A}$ 测定 -A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【注】1. 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 1mL 玻璃比色皿中。

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 0.3g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.6179x - 0.0046$ ，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 $1\mu\text{mol}$ 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤植酸酶活性}(\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A + 0.0046) \div 0.6179 \times V1 \div W \div T \\ &= 1.94 \times (\Delta A + 0.0046) \div W \end{aligned}$$

V1---孵育阶段的反应总体积，1.2mL； T---反应时间，1h； W---样本质量，g；

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 $5\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本

调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 1800uL 蒸馏水，混匀得到 0.5μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	300	
蒸馏水		300
试剂三	150	150
反应 mix	450	450
混匀，室温 (25°C) 静置 15min，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		