

## 植酸含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-QT017 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

植酸 (Phytic acid, 又称为肌醇六磷酸) 在多种植物组织 (特别是米糠与种子) 中作为磷的主要储存形式, 其结构是肌醇的 6 个羟基均被磷酸酯化生成的肌醇衍生物, 对种子的正常生长起着重要作用。植酸具有较强的螯合作用, 近几年的研究发现植酸作为抗氧化剂在保鲜、抗氧化等方面有一定作用。

植酸可使氯化铁-磺基水杨酸紫红色显色剂褪色, 且植酸含量与褪色程度成正比, 通过检测 500 nm 处吸光值的下降量进而得出样品中植酸含量。

### 二、试剂盒的组分与配制:

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度    | 注意事项                                                          |
|------|--------------|---------|---------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 110mL×1 瓶 | 4℃ 保存   |                                                               |
| 试剂一  | 粉体×2 支       | 4℃ 避光保存 |                                                               |
| 试剂二  | 粉体×2 瓶       | 4℃ 避光保存 |                                                               |
| 标准品  | 粉体×1 支       | 4℃ 保存   | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。 |

### 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)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### ① 组织样本:

称取烘干粉碎过 50 目筛的干样 0.1g 或鲜样 0.1g, 加入 1mL 提取液, 300rpm 室温震荡提取 30min 后 3800rpm, 4℃或室温离心 10min, 取上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

##### 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 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

##### ③ 液体样本: 澄清的液体样本直接测定, 若浑浊则离心后取上清检测。

#### 2、检测步骤:

##### ① 酶标仪预热 30min, 调节波长到 500 nm。

##### ② 显色剂 (紫红色) 配制: 临用前向一支试剂一中加入 1mL 蒸馏水混匀后全部转移至一瓶试剂二中, 再向试剂一中加入 1mL 蒸馏水涮洗管壁后全部转移至相应试剂二瓶中, 接着向该试剂二瓶中加入 3.5mL 的蒸馏水混匀, 即得到总体积为 5.5mL 的显色剂 (紫红色)。用不完的试剂 4℃保存并在三天内用完。

##### ③ 上清液稀释: 可先取 2 个样本预测, 确定适合本批样本的稀释浓度 D: 植酸含量高的样本, 可用提

取液做梯度稀释确定最佳稀释倍数，如稀释 2 倍、5 倍、10 倍。

④ 在 96 孔板中依次加入：

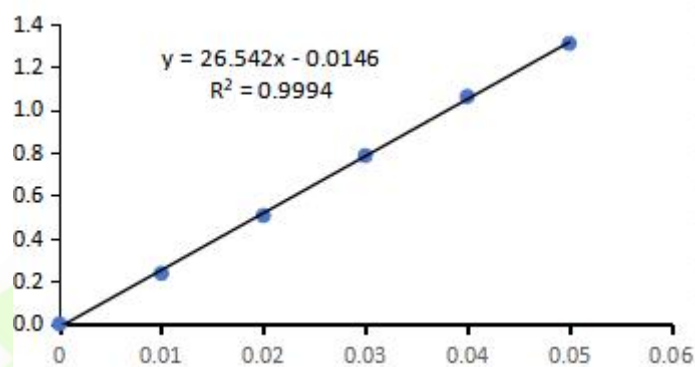
| 试剂组分 (μL)                                                              | 测定管 | 空白管<br>(仅做一次) |
|------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|
| 样本                                                                     | 50  |               |
| 蒸馏水                                                                    |     | 50            |
| 显色剂                                                                    | 100 | 100           |
| 蒸馏水                                                                    | 50  | 50            |
| 混匀，2min 后于 500nm 处读取 A 值， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。 |     |               |

【注】1.若 A 测定管的值小于 0.2 则需要将样本用提取液稀释后从新检测，如稀释 5 倍，稀释倍数 D 带入计算公式重新计算。

2.若  $\Delta A$  的值小于 0.05，则需要增加样本上样量 V1，如增至 100uL，同时蒸馏水相对减少以保持原体系不变，则改变后的 V1 重新带入计算公式计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 26.542x - 0.0146$ ，x 是标准品质量 (mg)，y 是  $\Delta A$ 。



2、按照蛋白浓度计算：

$$\text{植酸}(\text{mg}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 26.542] \div (\text{Cpr} \times V1 \div V) \times D = 0.754 \times (\Delta A + 0.0146) \div \text{Cpr} \times D$$

3、按样本鲜重计算：

$$\text{植酸}(\text{mg}/\text{g}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 26.542] \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.754 \times (\Delta A + 0.0146) \div W \times D$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{植酸}(\mu\text{g}/\text{g}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 26.542] \div (500 \times V1 \div V) \times 10^3 \times D = 754 \times (\Delta A + 0.0146) \div 500 \times D$$

5、按液体体积计算：

$$\text{植酸}(\text{mg}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 26.542] \div V1 \times D = 0.754 \times (\Delta A + 0.0146) \times D$$

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.05mL；

W---样本质量，g；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，若未稀释则值为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 标准品用 1mL 蒸馏水混匀溶解（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 10mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 标品稀释参照表如下：

|                                                   |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 1 mg/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>mg/mL                                     | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1   |
| 标品稀释液<br>uL                                       | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                              | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                         |     |     |     |     |     |     |

- 3 依据测定管加样表操作，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                                                 | 50  |              |
| 蒸馏水                                                |     | 50           |
| 显色剂                                                | 100 | 100          |
| 蒸馏水                                                | 50  | 50           |
| 混匀，2min 后于 500nm 处读取 A 值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。 |     |              |