

## 植酸酶 (Phytase) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-QT008 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。

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 30mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 10mL 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 12mL×1 瓶	4°C避光保存	
试剂四	粉剂 1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 10.4mL 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. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 再加入 2.6mL 蒸馏水, 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 瓶	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°C, 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°C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：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

## 2、检测步骤：

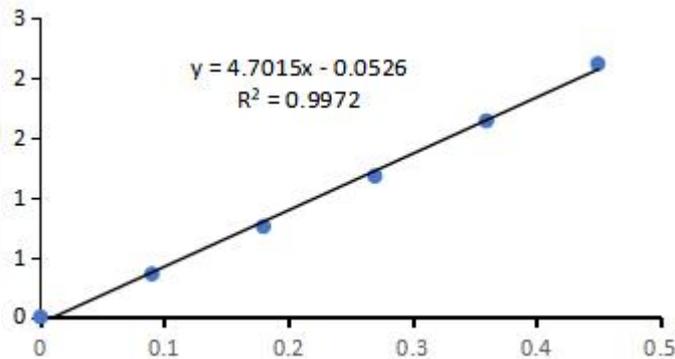
- ① 可见分光光度计预热 30min，调节波长至 700nm，蒸馏水调零。  
② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	90	90
试剂一		360
试剂二	360	
混匀，37°C水浴锅或恒温培养箱孵育 30min		
试剂三	225	225
反应 mix	225	225
混匀，37°C静置 15min，若浑浊，需 12000rpm 室温离心 10min，取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中，于 700nm 处检测， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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°C 温育时间（如 1 小时或更长），或者加大样本量（如 120μL，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： $y = 4.7015x - 0.0526$ ；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°C，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。

$$\text{植酸酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0526) \div 4.7015 \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 0.085 \times (\Delta A + 0.0526) \div \text{Cpr}$$

- 3、按照样本质量计算：

酶活定义：在 37°C，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。

$$\text{植酸酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0526) \div 4.7015 \div (W \times V1 \div V) \div T = 0.085 \times (\Delta A + 0.0526) \div W$$

- 4、按细胞数量计算：

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

$$\text{植酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0526) \div 4.7015 \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 79 \times (\Delta A + 0.0526) \div 500$$

- 5、按液体体积计算：

酶活定义：在 37°C，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( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ )= $(\Delta A+0.0526)\div 4.7015\div V1\div T=0.085\times(\Delta A+0.0526)$

V ---提取液体积, 1 mL;

V1 ---加入样本体积,  $90\mu\text{L}=0.09\text{mL}$ ;

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 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  $5\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。将母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 1, 2, 3, 4,  $5\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。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:

标品浓度 $\mu\text{mol}/\text{mL}$	0	1	2	3	4	5
标品稀释液 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。

试剂组分 ( $\mu\text{L}$ )	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
样本	90	
蒸馏水		90
试剂一		360
试剂二	360	
混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或恒温培养箱孵育 30min		
试剂三	225	225
反应 mix	225	225
混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 静置 15min, 若浑浊, 需 12000rpm 室温离心 10min, 取全部上清液至 1mL 玻璃比色皿中, 于 700nm 处检测, $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		