

## 植酸酶 (Phytase) 试剂盒说明书

(货号: G0905F 分光法 24 样)

### 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。

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 10mL 试剂一, 充分溶解备用,
试剂三	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 10.4mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 2.6mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 瓶	4℃ 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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、天平、低温离心机、恒温水浴锅, 可调式移液器。

### 四、植酸酶活性测定:

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

#### 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℃, 12000rpm 离心 10min, 取上清液待测。

② 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 1、上机检测:

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:

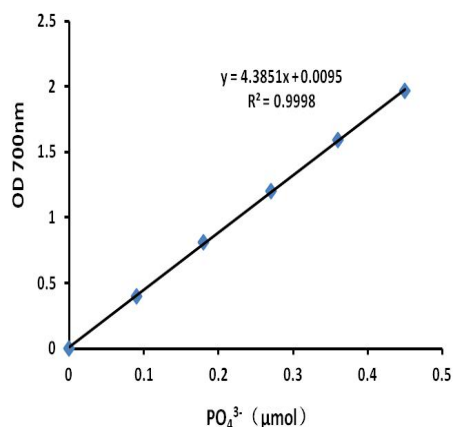
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	90	90
试剂一		360
试剂二	360	

混匀，37℃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℃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， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ （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℃温育时间（如 1 小时或更长），或者加大样本量（如 120 $\mu$ L，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： $y = 4.3851x + 0.0095$ ；x 为标准品质量（ $\mu$ mol），y 为吸光值 $\Delta A$ 。



2、按照蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每毫克蛋白每分钟释放 1 $\mu$ mol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{植酸酶活性} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0095) \div 4.3851 \div (\text{Cpr} \times V1) \div T \\ &= 0.085 \times (\Delta A - 0.0095) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按照样本质量计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每克样本每分钟释放 1 $\mu$ mol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{植酸酶活性} (\mu\text{mol}/\text{min} / \text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0095) \div 4.3851 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.085 \times (\Delta A - 0.0095) \div W \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 的条件下，每毫升液体每分钟释放 1 $\mu$ mol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性} (\mu\text{mol}/\text{min} / \text{mL}) = (\Delta A - 0.0095) \div 4.3851 \div V1 \div T = 0.085 \times (\Delta A - 0.0095)$$

V ---提取液体积，1 mL；

V1 ---加入样本体积，90 $\mu$ L=0.09mL；

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 制备标准品母液（5 $\mu$ mol/mL）：标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5.  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。