

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0467

Size: 100T/48S

植酸酶检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

植酸酶（phytase）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，它可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。

二、测定原理：

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显色剂反应生成蓝色复合物，在 700nm 处有特征吸收峰，根据 700nm 处吸光值变化可计算得植酸酶活性。

三、需自备的仪器和用品：

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、恒温水浴锅，超声溶解器，回旋式振荡器。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
缓冲液	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×2 支	4℃保存	临用前加缓冲液 4mL 配制，现用现配
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
显色剂	粉剂×6 瓶	4℃保存	临用前根据用量每瓶加 0.4mL 双蒸水溶解，再加 1.6mL 试剂三混匀。 样本处理

五、操作步骤：

1. 酶制剂：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：500~1000 的比例（建议称取约 0.001g，加入 1mL 提取液）加入提取液，在超声波溶解器上溶解 15min，再用回旋式振荡器振荡 15min，待测。
2. 组织：按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，在超声波溶解器上溶解 15min，再用回旋式振荡器振荡 15min，4℃，4000g 离心 10min，取上清待测。
3. 饲料样品：饲料烘干粉碎，过 40 目筛，按照质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）加入提取液，在超声波溶解器上溶解 15min，再用回旋式振荡器振荡 15min，4℃，4000g 离心 10min，取上清待测。

4. 培养液等液体样品，混匀直接测定。

	对照管	测定管
样本 (μL)	20	20
37°C 温育 5min		
试剂一 (μL)		80
试剂二 (μL)	100	
37°C 温育 30min		
试剂一 (μL)	80	
试剂二 (μL)		100
显色剂 (μL)	100	100
室温静置 10min, 4000g, 4°C, 离心 10min, 取上清 200 μL, 缓冲液调零测定 700nm 处吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

六、酶活性计算公式

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下 标准曲线: $y = 0.1084x + 0.0236$, $R^2 = 0.9998$

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每毫克蛋白每分钟从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0236) \div 0.1084 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times N = 4.613 \times (\Delta A - 0.0236) \div C_{\text{pr}} \times N$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每克样本每分钟从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol/min/g}) = (\Delta A - 0.0236) \div 0.1084 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ \div T \times N = 4.613 \times (\Delta A - 0.0236) \div W \times N$$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义：在 37°C，pH5.5 的条件下，每毫升液体每分钟从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol/min/mL}) = (\Delta A - 0.0236) \div 0.1084 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times N = 4.613 \times (\Delta A - 0.0236) \times N$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.3mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入样本体积，0.02mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白含量，mg/mL； W ：样本质量，g； N ：样品稀释倍数

● 用 96 孔板测定的计算公式如下

$$\text{标准曲线: } y = 0.0542x + 0.0236, R^2 = 0.9998$$

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义：在 37°C，pH5.5 的条件下，每毫克蛋白每分钟从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol/min/mg prot}) = (\Delta A - 0.0236) \div 0.0542 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \\ \div T \times N = 9.226 \times (\Delta A - 0.0236) \div C_{\text{pr}} \times N$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义：在 37°C，pH5.5 的条件下，每克样本每分钟从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol/min/g}) = (\Delta A - 0.0236) \div 0.0542 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \\ \div T \times N = 9.226 \times (\Delta A - 0.0236) \div W \times N$$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义：在 37°C，pH5.5 的条件下，每毫升液体每分钟从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) = $(\Delta A - 0.0236) \div 0.0542 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times N$

$$= 9.226 \times (\Delta A - 0.0236) \times N$$

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.3mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白含量, mg/mL; W : 样本质量, g; N : 样品稀释倍数。

七、注意事项:

1. 试剂三4℃保存一个月, 显色剂需要临用前根据用量配制, 每一瓶是20个样本的用量, 新配制的显色剂若有颜色则已经污染或者试剂过期, 应放弃使用。
2. 测定前先做预实验, 将待测样本的浓度调整到合适的范围, 并在计算公式中乘以稀释倍数。
3. 对照管与测定管加入试剂一和试剂二的顺序是相反的, 务必保证加入试剂时间的一致性, 以保证反应的准确性。