

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-S0745

Size: 50T/24S

植酸酶 (phytase) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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、1 mL 玻璃比色皿、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 50mL×1 瓶	4℃保存	—
缓冲液	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂一	粉剂×2 瓶	4℃保存	临用前加缓冲液 10mL 配制, 现用现配
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 24mL×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1mL双蒸水溶解, 再加4mL试剂三混匀

五、样本处理

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。

测定操作表

	对照管	测定管
样本（μL）	100	100
37℃温育 5min		
试剂一（μL）		400
试剂二（μL）	500	
37℃温育 30min		
试剂一（μL）	400	
试剂二（μL）		500
显色剂（μL）	500	500
室温静置10min，4000rpm，4℃，离心10min，取上清1mL，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

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。

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

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。

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

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。

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

$V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 1.5mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 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°C保存一个月, 显色剂需要临用前根据用量配制, 每一瓶是10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。