

植酸酶（phytase）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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，它能够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。

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。

自备实验用品及仪器：

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。

试剂组成和配制：

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×1 瓶，4℃ 保存，临用前加缓冲液 10mL 配制，现用现配；用不完的试剂 4℃ 保存一个月。

试剂二：液体 25mL×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 试剂二混匀。

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）进行冰浴匀浆，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）进行冰浴匀浆，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		
缓冲液 (μL)	400	
试剂一 (μL)		400
混匀, 37℃温育 30min		
95℃, 10min 终止反应, 冷却至室温		
显色剂 (μL)	500	500
混匀, 37℃静置 15min, 10000g, 室温, 离心 5min, 取上清, 蒸馏水调零, 测定 700nm 处吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。		

酶活性计算公式:

标准曲线: $y = 0.2764x + 0.0082$, $R^2 = 0.9998$; x 为标准品浓度 (μmol/mL), y 为吸光值。

1. 按照蛋白浓度计算

酶活性定义: 在 37℃, 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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div \text{Cpr} \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div \text{Cpr}$$

2. 按照样本质量计算

酶活性定义: 在 37℃, 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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol}/\text{min} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div W \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div W$$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义: 在 37℃, 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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol}/\text{min} / \text{mL}) = (\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082)$$

Cpr: 样本蛋白含量, mg/mL; W: 样本质量, g; T: 反应时间, 30min。

注意事项:

1、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、 ΔA 线性范围为 0.01-2。