# 植酸酶（phytase）试剂盒说明书

**微量法 100T/48S**

**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/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。

**试剂组成和配制：**

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

缓冲液：液体 15mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：粉剂×1 支，4℃保存，临用前加缓冲液 6mL 配制，现用现配；用不完的试剂 4℃保存一个月。

试剂二：液体 15mL×1 瓶，4℃保存。

显色剂：粉剂×8 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） | 30 | 30 |
| 37℃温育 5min | | |
| 缓冲液（μL） | 120 | |
| 试剂一（μL） | | 120 |
| 混匀，37℃温育 30min | | |
| 95℃，10min 终止反应，冷却至室温 | | |
| 显色剂（μL） | 150 | 150 |
| 混匀，37℃静置 15min，10000g，室温，离心 5min，取上清 200μL，测定 700nm 处吸光值，△A=A 测定管-A 对照管。每个测定管设一个对照管。 | | |

**酶活性计算公式：**

**a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

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°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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（μmol/min/mg prot）=（ΔA-0.0082）÷0.2764÷Cpr÷T =0.1206×（ΔA-0.0082）÷Cpr2．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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（μmol/min /g 鲜重）=（ΔA-0.0082）÷0.2764÷W÷T =0.1206×（ΔA-0.0082）÷W

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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（μmol/min /mL）=（ΔA-0.0082）÷0.2764÷T =0.1206×（ΔA-0.0082）

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

**b. 用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准曲线：y = 0.1382x + 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°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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（μmol/min/mg prot）=（ΔA-0.0082）÷0.1382÷Cpr÷T = 0.2412×（ΔA-0.0082）÷Cpr

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 1μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（μmol/min /g 鲜重）=（ΔA-0.0082）÷0.1382÷W÷T =0.2412×（ΔA-0.0082）÷W

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 1μmol 的无

机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（μmol/min /mL）=（ΔA-0.0082）÷0.1382÷T =0.2412×（ΔA-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 13 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 0.01-1。