

植酸酶 (phytase) 检测试剂盒 (微量法)

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。

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。

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：

- 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。
- 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。
- 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。
- 培养液等液体样品, 混匀直接测定。

测定步骤表：

	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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管设一个对照管。

酶活性计算公式：

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（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， 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 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

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

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 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

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

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 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

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

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

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（ $\mu\text{mol/mL}$ ）， 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 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（ $\mu\text{mol/min/mg prot}$ ）= $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div \text{Cpr} \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div \text{Cpr}$

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 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（ $\mu\text{mol/min/g 鲜重}$ ）= $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div W \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div W$

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 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

植酸酶活性（ $\mu\text{mol/min/mL}$ ）= $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082)$

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 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。