

植酸酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYFA9-C24	植酸酶活性检测试剂盒	24T	常量法
AYFA9-C48		48T	

一、测定意义：

植酸酶（Phytase）又叫肌醇六磷酸酶，是一种蛋白质和糖的结合酶，植酸酶可以分解植酸产生无机磷和肌醇，极大的提高生物对养分的利用率，天然植酸酶广泛存在于植物、动物组织和微生物中，现多用微生物来合成植酸酶进行生产应用，植酸酶在粮食生产、畜牧养殖领域具有广泛的研究价值。

二、测定原理：

在一定的环境条件下，植酸酶可以分解植酸钠（肌醇六磷酸十二钠）产生无机磷和肌醇衍生物，在酸性条件下，无机磷和钼酸铵显色剂发生反应，产生蓝色的钼蓝物质，其在 700nm 有特征吸收峰，通过测定无机磷的含量，可计算出植酸酶的活性。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	粉剂×1 支	粉剂×1 支	2~8℃保存
试剂二	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一制备液：临用前将试剂一粉剂加入到试剂二中（可吸取试剂二到试剂一瓶中反复冲洗），充分震荡溶解备用。			
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2~8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×2 支	2~8℃保存
工作液的配制：临用前在每支试剂三粉剂中加入 6mL 硫酸溶液（1.4mL 浓硫酸+5mL 蒸馏水混合而成）混匀溶解后，加入试剂四粉剂混匀溶解，随后用蒸馏水稀释 6 倍使用。			
标准品	液体 1.5mL×1 支	液体 1.5mL×1 支	2~8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎机冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、细菌/细胞：按照细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 200W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 5min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

测定步骤

1、分光光度计预热30min 以上，调节波长至700nm，蒸馏水调零。

2、将5μmol/mL标准液用蒸馏水稀释至2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.0156μmol/mL备用。

3、操作表（在 EP 管中操作）：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
样本（μL）	200	200	-	-
37℃水浴保温 5min			-	-
试剂一制备液（μL）	480	-	-	-
混匀，37℃保温 30min，沸水浴 10min			-	-
试剂一制备液（μL）	-	480	-	-
不同浓度标准液（μL）	-	-	200	-
蒸馏水（μL）	-	-	480	680
工作液（μL）	600	600	600	600
混匀，常温反应 10min，10000g，离心 10min，于 700nm 处测定吸光度值，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。分别计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ （每个测定管需设置一个对照管）。				

五、植酸酶活性的计算：

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x，μmol/mL）和吸光度 $\Delta A_{\text{标准}}$ （y， $\Delta A_{\text{标准}}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入公式计算样本浓度（x，μmol/mL）。

2、按血清（浆）等液体体积计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 环境下，每 mL 样本每分钟在反应体系释放 1μmol 无机磷为 1 个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 (U/mL)} = x \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样}} \div T = x \div 30$$

3、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 环境下，每 mg 组织蛋白每分钟在反应体系释放 1μmol 无机磷为 1 个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) \div T = x \div C_{\text{pr}} \div 30$$

4、按样本质量计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 环境下，每 g 组织每分钟在反应体系释放 1μmol 无机磷为 1 个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 (U/g 质量)} = x \times V \text{ 样总} \div W \div T = x \div W \div 30$$

5、按细胞/细菌数量计算：

酶活定义：在 37℃，pH5.5 环境下，每 10⁴个细胞每分钟在反应体系释放 1μmol 无机磷为 1 个酶活力单位。

$$\text{植酸酶活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V \text{ 样总} \div N \div T = x \div N \div 30$$

V 样：加入样本体积，0.2mL；

V 样总：提取液体积，1mL；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g；

T：反应时间，30min；

N：细胞数量，以万计。

六、注意事项：

- 1、为防止沸水浴10min 过程中水分散失，建议使用螺旋口EP管或用封口膜给EP管缠口。
- 2、如果测定吸光值过低或接近空白，适当延长第二步的37℃水浴反应时间或加大样本量后，重新测定。如果 A测定大于1.5 或者 Δ A超过检测范围，建议将样本用蒸馏水适当稀释后进行测定。注意同步修改计算公式。
- 3、结果于40min内测定完毕。