

## 土壤植酸酶 (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。

**自备实验用品及仪器**

天平、低温离心机、酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅, 甲苯 (不允许快递)。

**试剂的组成和配制**

缓冲液: 液体 60mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4°C 避光保存, 临用前加缓冲液 30mL 配制, 现用现配; 用不完的试剂 4°C 保存一个月。

试剂二: 液体 15mL×1 瓶, 4°C 保存。

显色剂: 粉剂×6 管, 4°C 避光保存, 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**

新鲜土样自然风干或 37 度烘箱风干, 过 30~50 目筛。

**测定操作表**

	对照管	测定管
样本 (g)	0.03	0.03
甲苯 (μL)	20	20
振荡混匀, 室温放置 15min		
缓冲液 (μL)	500	
试剂一 (μL)		500
混匀, 37°C 孵育 24h, 10000g, 4°C 离心 5min, 取上清		
上清	100	100
显色剂 (μL)	100	100
混匀, 静置 15min, 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:  $y = 0.8795x + 0.0084$ ,  $R^2 = 0.9977$ ; x 为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ), y 为吸光值  $\Delta A$ 。

**酶活性定义:** 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每克土样每小时从 5mmol/L 的植酸钠溶液中释放出 1 $\mu\text{mol}$  的无机磷为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol/d/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0084) \div 0.8795 \times V_{\text{反应}} \div W \div T \\ &= 19.68 \times (\Delta A - 0.0084) \end{aligned}$$

V 反应: 反应总体积, 0.52mL; T: 反应时间, 1d; W: 样本质量, 0.03g。

#### 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、 $\Delta A$  线性范围为 0.01-0.5。