

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、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°C静置 15min, 10000g, 室温, 离心 5min, 取上清 200μL, 测定 700nm 处吸光值, ΔA=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) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div Cpr \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div Cpr$

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) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div W \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div W$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义: 在 37°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) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.2764 \div T = 0.1206 \times (\Delta A - 0.0082) \div T$

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) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div Cpr \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div Cpr$

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) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div W \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div W$

3. 培养液等液体样品

酶活性定义: 在 37°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) = $(\Delta A - 0.0082) \div 0.1382 \div T = 0.2412 \times (\Delta A - 0.0082) \div T$

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。