

植酸酶 (phytase) 试剂盒说明书

(货号: G0905W 微板法 48 样)

一、产品简介:

植酸酶 (phytase, EC.3.1.3.8) 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, 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。

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特异显色剂反应生成蓝色复合物, 通过在 700nm 处检测该有色物质颜色的生成速率即可计算植酸酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 7mL 试剂一, 充分溶解备用,
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4°C 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 8mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加入 2mL 蒸馏水, 充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

反应 mix 的制备 (现配现用): 试剂四: 五按照 4:1 的比例混合, 可根据样本数量配制需要量, 若一次性用完, 可把试剂五一次性全部倒入试剂四中, 混合备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、低温离心机、恒温水浴锅, 可调式移液器。

四、植酸酶活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本的制备:

- ① 组织样本: 取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4°C, 12000rpm 离心 10min, 取上清液待测。
- ② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- ③ 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min, 调节波长至 700nm。在 EP 管中依次加入:

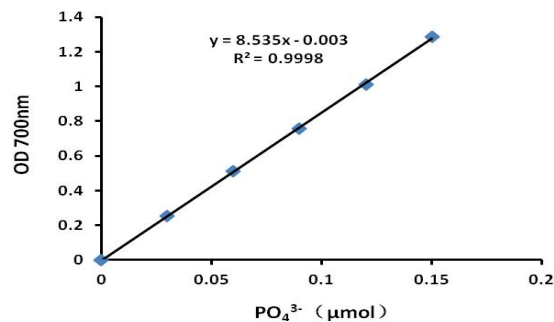
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	30	30
试剂一		120

试剂二	120	
37°C水浴锅或恒温培养箱孵育 30min		
试剂三	75	75
反应 mix	75	75
混匀, 37°C静置 15min, 若浑浊, 需 12000rpm 室温离心 10min, 取上清 200μL 至 96 孔板中, 于 700nm 处检测, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【注】若ΔA 在零附近, 可以延长 37°C温育时间 (如 1 小时或更长), 或者加大样本量 (如 50μL, 则试剂一或二相应减少), 改变后的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 8.535x - 0.003$; x 为标准品质量 (μmol), y 为吸光值ΔA。



2、按照蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每毫克蛋白每分钟释放 1μmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.003) \div 8.535 \div (\text{Cpr} \times V1) \div T = 0.13 \times (\Delta A + 0.003) \div \text{Cpr}$$

3、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每克样本每分钟释放 1μmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = (\Delta A + 0.003) \div 8.535 \div (W \times V1 \div V) \div T = 0.13 \times (\Delta A + 0.003) \div W$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每 10⁴ 个细胞每分钟释放 1nmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.003) \div 8.535 \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 130 \times (\Delta A + 0.003) \div 500$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 在 37°C, pH5.5 的条件下, 每毫升液体每分钟释放 1μmol 的无机磷定义为一个酶活力单位。

$$\text{植酸酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A + 0.003) \div 8.535 \div V1 \div T = 0.13 \times (\Delta A + 0.003)$$

V ---提取液体积, 1 mL;

V1 ---加入样本体积, 30μL = 0.03mL;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 30min。

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5μmol/mL): 标准品用 10mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 1, 2, 3, 4, 5. μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。