

土壤植酸酶（phytase）试剂盒说明书

（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。

土壤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反应生成蓝色复合物，通过在 700nm 处检测该有色物质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
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 28mL 试剂一，充分溶解备用，
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 16mL 蒸馏水，充分溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加入 4mL 蒸馏水，充分溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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、土壤植酸酶活性测定：

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

1、样本制备：

取新鲜土样风干或者 30℃烘箱风干，先粗研磨，过 40 目筛备用。

【注】：土壤风干，减少土壤中水分对于实验的干扰；土壤过筛，保证取样的均匀细腻；

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
土壤	0.1g	0.1g
试剂一		500
试剂二	500	
混匀，37℃振荡培养 1 小时		

试剂三	100	100
混匀，室温条件下 10000rpm，离心 5min。上清液待测。		

③ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

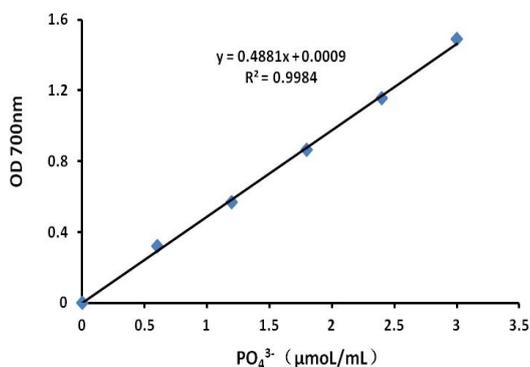
上清液	100	100
试剂三	50	50
反应 mix	150	150
混匀，室温（25℃）静置 15min，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个测定管需设一个对照管）。		

【注】1. 若显色反应阶段静置后出现浑浊现象，静置结束后可先于室温 10000rpm，离心 5min 后，再取全部上清液至 96 孔板中，

2. 若 ΔA 值在零附近徘徊，可在 37℃ 孵育阶段延长反应时间 T (如增至 3h 或更长)，或增加土壤样本量 W (如增至 0.2g)，则改变后的反应时间 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.4881x + 0.0009$ ，x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 是 ΔA 。



2、酶活定义：37℃条件下，pH5.5 的条件下，每克土样每小时释放出 1 μmol 的无机磷为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{土壤植酸酶活性}(\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0009) \div 0.4881 \times V1 \div W \div T \\ &= 1.23 \times (\Delta A - 0.0009) \div W \end{aligned}$$

V1---孵育阶段的反应总体积，0.6mL； T---反应时间，1h； W---样本质量，g；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（5 $\mu\text{mol/mL}$ ）：标准品用 10mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用）。
- 2 把母液用试剂一稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。