

## 土壤植酸酶（phytase）试剂盒说明书

分光光度法 50T/24S

**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，它能够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、1mL 玻璃比色皿、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℃ 保存。

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃ 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℃ 保存一个月。

试剂二：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存。

显色剂：粉剂×6 瓶，4℃ 避光保存，临用前根据用量每瓶加 1mL 双蒸水溶解，再加 4mL 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）	0.06	0.06
甲苯	40	40
振荡混匀，室温放置 15min		
缓冲液（ $\mu\text{L}$ ）	1000	
试剂一（ $\mu\text{L}$ ）		1000
混匀，37℃ 孵育 24h，10000g，4℃ 离心 5min，取上清		
上清	500	500
显色剂（ $\mu\text{L}$ ）	500	500
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：  $y = 1.759x + 0.0084$ ，  $R^2 = 0.9977$ ；  $x$  为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ )，  $y$  为吸光值  $\Delta A$ 。

酶活性定义：在  $37^\circ\text{C}$ ，  $\text{pH}5.5$  的条件下，每克土样每小时从  $5\text{mmol/L}$  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。

$$\begin{aligned} \text{植酸酶活性 } (\mu\text{mol/h/g 土样}) &= (\Delta A - 0.0084) \div 1.759 \times V_{\text{反总}} \div W \div T \\ &= 0.41 \times (\Delta A - 0.0084) \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，  $1.04\text{mL}$ ；  $T$ ：反应时间，  $24\text{h}$ ；  $W$ ：样本质量，  $0.06\text{g}$ 。

**注意事项：**

- 1、显色剂需要临用前根据用量配制，每一瓶是 5 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  $0.01-1$ 。