

土壤植酸酶试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TR059 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 28mL 试剂一, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 25mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 16mL 蒸馏水, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 4mL 试剂三, 充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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、样本提取：

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 700nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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：

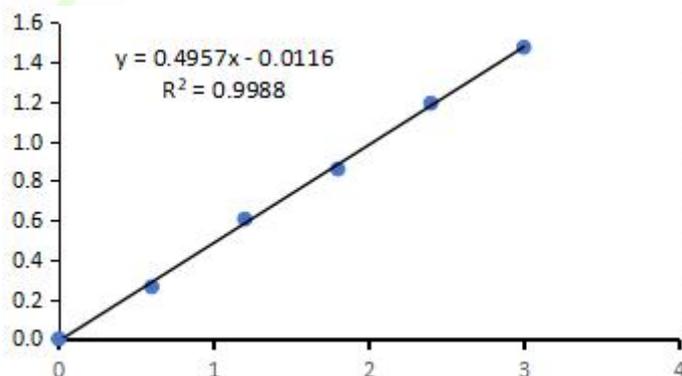
上清液	100	100
试剂三	50	50
反应 mix	150	150
混匀，室温 (25℃) 静置 15min，于 700nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管需设一个对照管)。		

【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： $y = 0.4957x - 0.0116$ ，x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)，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。

土壤植酸酶活性($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{g}$ 土样) = $(\Delta A + 0.0116) \div 0.4957 \times V1 \div W \div T$

$$=1.21 \times (\Delta A + 0.0116) \div W$$

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 标准品用 10mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用), 标准品母液浓度为 5 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 600 μ L, 加入 400 μ L 蒸馏水, 混匀得到 3 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	100	
蒸馏水		100
试剂三	50	50
反应 mix	150	150
混匀, 室温 (25 $^{\circ}$ C) 静置 15min, 于 700nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		