



## 土壤植酸酶活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC5375

规格：100T/48S

**产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 3mL×1 瓶（自备）	2-8℃保存
试剂二 A	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 B	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

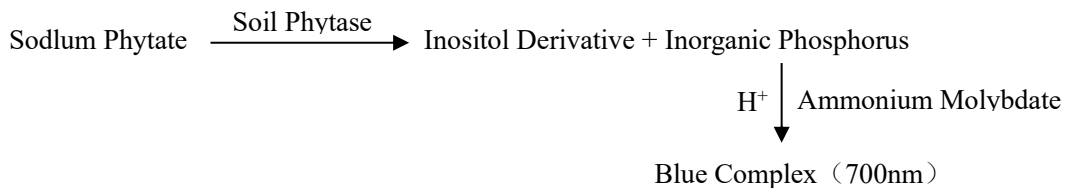
溶液的配制：

1. 试剂一：甲苯，需自备。
2. 试剂二：临用前将试剂二 B 全部倒入试剂二 A 中，充分震荡溶解，用不完的试剂 2-8℃可保存 4 周。
3. 试剂三：临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解，再将枪头伸入液面下缓慢加入 0.81mL 浓硫酸，用不完的试剂 2-8℃可保存 4 周。
4. 试剂四：临用前加入 13mL 蒸馏水充分溶解，再加入 20μL 浓硫酸，用不完的试剂 2-8℃可保存 4 周。
5. 工作液：临用前根据测定数量将试剂三：试剂四=1mL：5mL（约 60T，可根据样本量按比例调整）的比例混匀，配制后于 2-8℃可保存 3 天。
6. 标准品：10μmol/mL 无机磷标准液。

### 产品说明：

植酸酶（Phytase）又叫肌醇六磷酸酶，是一种蛋白质和糖的结合酶，植酸酶可以分解植酸产生无机磷和肌醇，极大的提高生物对养分的利用率。土壤植酸酶主要来自于土壤中的微生物，在磷素循环中起着重要作用，土壤植酸酶在土壤改良和农业可持续发展领域具有较强的应用前景。

在一定的环境条件下，土壤植酸酶可以分解植酸钠（肌醇六磷酸十二钠）产生无机磷和肌醇衍生物，在酸性条件下，无机磷和钼酸铵显色剂发生反应，产生蓝色的钼蓝物质，其在 700nm 有特征吸收峰，通过测定无机磷的含量，可计算出土壤植酸酶的活性。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 需自备的仪器和用品：

酶标仪/可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、研钵、30-50目筛、甲苯、浓硫酸、96孔板/微量玻璃比色皿、冰和蒸馏水。

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

新鲜土样自然风干或 37°C烘箱风干，过 30~50 目筛。

### 二、测定步骤

1、酶标仪/可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 700nm。可见分光光度计用蒸馏水调零。

2、标准溶液的稀释：将10 $\mu$ mol/mL无机磷标准液用蒸馏水稀释至1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125、0.039、0.02、0.01 $\mu$ mol/mL备用。

3、标准溶液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 ( $\mu$ mol/mL)	标准液体积 ( $\mu$ L)	蒸馏水体积 ( $\mu$ L)	稀释后浓度 ( $\mu$ mol/mL)
1	10	100	700	1.25
2	1.25	200	200	0.625
3	0.625	200	200	0.3125
4	0.3125	200	200	0.15625
5	0.15625	200	200	0.078125
6	0.078125	200	200	0.039
7	0.039	200	200	0.02
8	0.02	200	200	0.01

备注：实验中每个标准管需 100 $\mu$ L 标准溶液。

### 4、在离心管中按下表步骤加样：

试剂名称	测定管	对照管	标准管	空白管
土样(g)	0.03	0.03	-	-
试剂一( $\mu$ L)	20	20	-	-
振荡，用试剂一将土样浸湿（潮湿状态即可），室温放置 15min			-	-
试剂二( $\mu$ L)	500	-	-	-
混匀，37°C水浴/恒温培养 24h，沸水浴 10min			-	-
试剂二( $\mu$ L)	-	500	-	-
10000g，25°C离心 5min，取上清，以下步骤可直接加在 96 孔板或微量玻璃比色皿中。			-	-
标准液( $\mu$ L)	-	-	100	-
蒸馏水( $\mu$ L)	-	-	-	100
上清液( $\mu$ L)	100	100	-	-
工作液( $\mu$ L)	100	100	100	100

室温静置 15min，于 700nm 处测定吸光值，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。分别计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白（标准曲线和空白管只需做 1-2 次，每个测定管需设置一个对照管）。

### 三、土壤植酸酶活性的计算

#### 1. 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度 (x,  $\mu\text{mol/mL}$ ) 和吸光度  $\Delta A$  标准 (y,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将  $\Delta A$  测定 (y,  $\Delta A$  测定) 代入公式计算样本浓度 (x,  $\mu\text{mol/mL}$ )。

#### 2. 土壤植酸酶活性计算

单位定义: 37°C下每 g 土壤每天在反应体系释放  $1\mu\text{mol}$  无机磷为 1 个酶活力单位。

土壤植酸酶活性 (U/g) =  $x \times V \text{ 反总} \div W \div T = 0.52x \div W$

V 反: 反应体系总体积, 0.52mL; W: 土壤质量, g; T: 反应时间, 24h=1d。

#### 注意事项:

1. 为防止沸水浴 10min 过程中水分散失, 建议使用螺旋盖的离心管或用封口膜给 EP 管缠口。
2. 如果  $\Delta A$  测定 < 0.01, 适当延长第一步 37°C 反应时间或加大样本量后, 重新测定。如果  $\Delta A$  测定 > 1.2, 建议将上清液用蒸馏水适当稀释后进行测定, 注意乘以稀释倍数。
3. 结果于 30min 内测定完毕, 尽量保证所有样本测定时间的一致性。

#### 实验实例:

1. 取 0.03g 三叶草土壤, 按照测定步骤操作, 在 96 孔板中测得 A 测定 = 0.359, A 对照 = 0.28,  $\Delta A$  测定 = 0.079, 将  $\Delta A$  代入标曲公式  $y = 1.1104x + 0.0077$ , 得出  $x = 0.0642$ , 按样本质量计算酶活得:  
土壤植酸酶活性 (U/g) = 1.113 U/g。
2. 取 0.03g 蘑菇土土壤, 按照测定步骤操作, 在 96 孔板中测得 A 测定 = 0.442, A 对照 = 0.32,  $\Delta A$  测定 = 0.122, 将  $\Delta A$  代入标曲公式  $y = 1.1104x + 0.0077$ , 得出  $x = 0.1029$ , 按样本质量计算酶活得:  
土壤植酸酶活性 (U/g) = 1.784 U/g。

#### 参考文献:

- [1] Berry D F, Shang C, Zelazny L W. Measurement of phytase activity in soil using a chromophoric tethered phytic acid probe[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2009, 41(2):192-200.
- [2] Marshall, Arebojie, Azeke, et al. Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Journal of Food Science & Technology, 2011, 48(6):724-729.

#### 相关系列产品:

- BC0140/BC0145 土壤酸性磷酸酶 (S-ACP) 活性检测试剂盒
- BC0460/BC0465 土壤中性磷酸酶 (S-NP) 活性检测试剂盒
- BC0280/BC0285 土壤碱性磷酸酶 (S-AKP/ALP) 活性检测试剂盒
- BC0270/BC0275 土壤中性蛋白酶活性检测试剂盒
- BC0390/BC0395 土壤脱氢酶 (S-DHA) 活性检测试剂盒