

单宁酶 (Tannase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YHKY005-96 微板法 96 样)

一、产品简介:

单宁酶全称是单宁酯酰水解酶(Tannase, EC 3.1.1.20), 可水解没食子酸单宁中的酯键和缩酚羧键, 生成没食子酸和葡萄糖。单宁酶分布广, 用途多; 其研究与应用已深入到食品加工、饲料加工、化妆品生产及皮革制作工艺过程中。

单宁酶的测定采用绕丹宁法, 该法以没食子酸丙酯 (PG) 作为反应的底物, 单宁酶分解没食子酸丙酯 (PG) 产生的没食子酸可与绕丹宁在碱性条件下形成红色复合物, 该复合物在 520nm 处有最大吸收, 据此可通过测定 A520 的变化量计算得出单宁酶活力大小。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前离心或甩几下使试剂落入底部, 再加 6mL 提取液 80°C加热溶解。
试剂二	液体 6mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 85mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 1 瓶	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该标品。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、单宁酶活性测定:

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、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4°C×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

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 (10⁴): 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 以上, 调节波长至 520nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 1mLEP 管中依次加入:

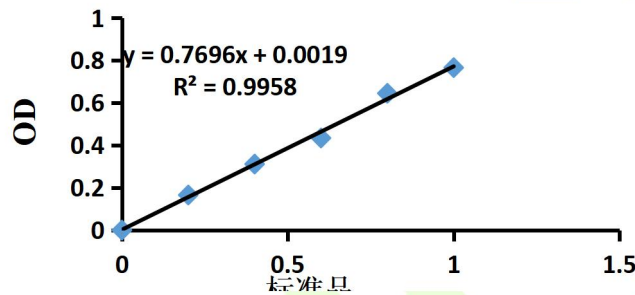
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	25	
试剂一	25	25
混匀, 30°C 孵育 5min		
试剂二	30	30
混匀, 30°C 孵育 5min		

试剂三	420	420
样本		25
混匀，30°C孵育 5min，取出 200μL 至 96 孔板中，于 520nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

【注】：若 ΔA 在零附近徘徊，可增加样本取样质量；若 A 测定大于 1.5，可用蒸馏水稀释样本，稀释倍数 D 代入公式计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.7696x + 0.0019$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

单位定义：在 30°C条件下，每克组织每分钟降解没食子酸丙酯生成 1nmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol/min/g 重量}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 0.7696 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 260 \times (\Delta A - 0.0019) \div W \times D$$

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 30°C条件下，每毫克组织蛋白每分钟降解没食子酸丙酯生成 1nmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol/min/mg prot}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 0.7696 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times D = 260 \times (\Delta A - 0.0019) \div \text{Cpr} \times D$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：在 30°C条件下，每 10^4 个细胞每分钟降解没食子酸丙酯生成 1nmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.0019) \div 0.7696 \times V1 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D = 0.52 \times (\Delta A - 0.0019) \times D$$

V--提取液的总体积，1mL； V1--加入样本体积，0.025mL；

T---反应时间，5min； W---样本质量，g； 500---细胞数量；

Cpr---样本蛋白质浓度，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 ($10\mu\text{mol/mL}$)：标准品溶解在 1mL 提取液中，充分混匀。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, $1\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 25μL 标准品+25μL 提取液+30μL 试剂二，混匀，30°C孵育 5min，再加 420μL 试剂三，30°C孵育 5min，取出 200μL 至 96 孔板中，于 520nm 处读值，根据结果即可制作标准曲线。