

## 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 有效期：3 个月）

### 一、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度  | 注意事项                                                                     |
|------|--------------|-------|--------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                                                                          |
| 试剂一  | 粉体 1 瓶       | 4℃ 保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 加入 6mL 提取液 80℃ 加热溶解；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂二  | 液体 6mL×1 瓶   | 4℃ 保存 |                                                                          |
| 试剂三  | 液体 85mL×1 瓶  | 4℃ 保存 |                                                                          |
| 标准品  | 粉体 1 支       | 4℃ 保存 | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。             |

### 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：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

- 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℃×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℃ 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（10<sup>4</sup>）：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、检测步骤：

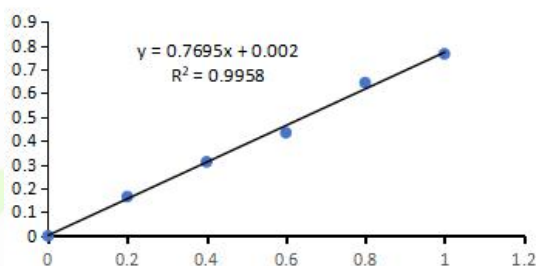
- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 520nm。
- ② 所有试剂解冻至室温，在 1mLEP 管中依次加入：

| 试剂组分 (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, ΔA = A 测定 - A 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  $y = 0.7695x + 0.002$ ；x 为标准品浓度 (μmol/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)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 重量}) = [(\Delta A - 0.002) \div 0.7695 \times V1 \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D = 259.9 \times (\Delta A - 0.002) \div W \times D$$

### 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)。

$$\begin{aligned} \text{单宁酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.002) \div 0.7695 \times V1 \times 10^3] \div (V1 \times Cpr) \div T \times D \\ &= 259.9 \times (\Delta A - 0.002) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

### 4、按液体体积计算：

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)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.002) \div 0.7695 \times V1 \times 10^3] \div V1 \div T \times D = 259.9 \times (\Delta A - 0.002) \times D$$

### 5、按细胞数量计算：

酶活定义：在 30°C 条件下，每 10<sup>4</sup> 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)。

$$\begin{aligned} \text{单宁酶}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.002) \div 0.7695 \times V1 \times 10^3] \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D \\ &= 0.52 \times (\Delta A - 0.002) \times D \end{aligned}$$

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 制备标准品母液（10 $\mu$ mol/mL）：标准品溶解在 1mL 提取液中，充分混匀；
- 3 将母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1 $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

|                                                          |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 提取液，混匀得到 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                     | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 标品稀释液<br>uL                                              | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 提取液 uL                                                   | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                |     |     |     |     |     |     |

- 5 依据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。

| 试剂组分 ( $\mu$ L)                                                                                | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                             | 25  |              |
| 提取液                                                                                            | 25  | 50           |
| 试剂二                                                                                            | 30  | 30           |
| 混匀，30°C 孵育 5min                                                                                |     |              |
| 试剂三                                                                                            | 420 | 420          |
| 混匀，30°C 孵育 5min，取出 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，于 520nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |              |