

单宁酶 (Tannase) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-YHKY005-48 分光法 48 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 60mL×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); 2. 加入 4mL 提取液 80℃加热溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 60mL×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; 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。

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 (10^4): 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:

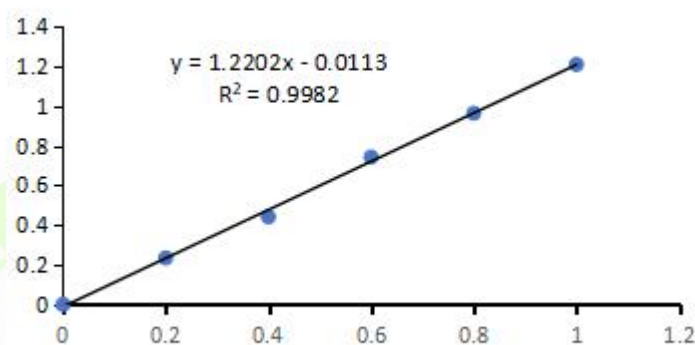
- ① 可见分光光度计预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 520nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温, 在 1mLEP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	35	
试剂一	35	35
混匀, 30℃孵育 5min		
试剂二	40	40
混匀, 30℃孵育 5min		
试剂三	580	580
样本		35
混匀, 30℃孵育 5min, 反应液全部转入 1mL 玻璃比色皿中, 于 520nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A$ 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 $y = 1.2202x - 0.0113$; 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℃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)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol/min/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0113) \div 1.2202 \times V_1 \times 10^3] \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D = 163.9 \times (\Delta A + 0.0113) \div W \times D$$

3、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 在 30℃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)。

$$\begin{aligned} \text{单宁酶}(\mu\text{mol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0113) \div 1.2202 \times V_1 \times 10^3] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times D \\ &= 163.9 \times (\Delta A + 0.0113) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算:

单位定义: 在 30℃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)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0113) \div 1.2202 \times V_1 \times 10^3] \div V_1 \div T \times D = 163.9 \times (\Delta A + 0.0113) \times D$$

5、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 30℃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)。

$$\text{单宁酶}(\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0113) \div 1.2202 \times V_1 \times 10^3] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$=0.3278 \times (\Delta A + 0.0113) \times D$$

V--提取液的总体积, 1mL;

V1--加入样本体积, 0.035mL;

T---反应时间, 5min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

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 μ 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 μ 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 100 μ L, 加入 900 μ L 提取液, 混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 μ L	0	40	80	120	160	200
提取液 μ L	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 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	35	
提取液	35	70
试剂二	40	40
混匀, 30 $^{\circ}$ C 孵育 5min		
试剂三	580	580
混匀, 30 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 取出全部液体至 1ml 比色皿中, 于 520nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		