

## 单宁酶（Tannase）活性测定试剂盒说明书

（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℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃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℃加热溶解。
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 mg×1 瓶	4℃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℃×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、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：

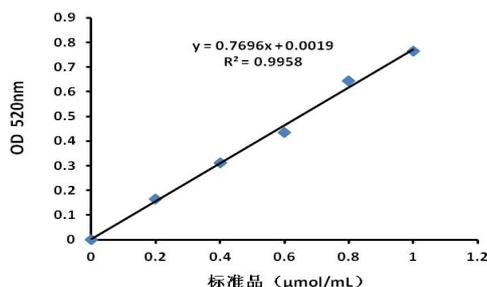
试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
样本	25	
试剂一	25	25
混匀，30℃孵育 5min		
试剂二	30	30
混匀，30℃孵育 5min		
试剂三	420	420

样本		25
混匀，30℃孵育 5min，取出 200μL 至 96 孔板中，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 $\Delta A$  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 $\Delta A$ 。



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）。

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

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）。

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

4、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）。

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

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 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℃孵育 5min，再加 420μL 试剂三，30℃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。