

## Tannase Kit

### 单宁酶活性测定试剂盒说明书

货号: G0141W | 方法: 微板法 | 规格: 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 mg×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 mg×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 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例提取。

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:

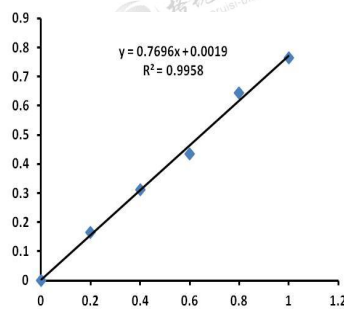
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	25	
试剂一	25	25
混匀, 30°C 孵育 5min		

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， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ （每个样本需做一个自身对照）。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

## 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  $\Delta A$ 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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）。

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

3、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：在 30°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）。

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

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）。

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

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。