

## 单宁酶活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

**注意：**本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4070

规格：50T/24S

**产品组成：**使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

| 试剂名称 | 规格           | 保存条件   |
|------|--------------|--------|
| 提取液  | 液体 75 mL×2 瓶 | 2-8℃保存 |
| 试剂一  | 粉剂×2 支       | 2-8℃保存 |
| 标准品  | 粉剂×1 支       | 2-8℃保存 |

**溶液的配制：**

- 1、试剂一：临用前取 1 支加入 1.5 mL 无水乙醇混匀溶解，用不完的试剂可以 2-8℃保存一周；
- 2、标准品：5 mg 没食子酸丙酯。临用前加入 1.178 mL 无水乙醇充分混匀溶解，配成 20 μmol/mL 的标准溶液，2-8℃保存两周。

**产品说明：**

单宁酶全称是单宁酯酰水解酶(Tannase, EC 3.1.1.20)，存在于富含单宁的植物，也广泛存在于微生物中，可以水解酯键和缩酚羧键，生成没食子酸和葡萄糖。

使用没食子酸丙酯（PG）作为单宁酶酶促反应的底物，其在270nm下有特征吸收峰，根据其反应前后吸光度的变化来计算单宁酶活力。



**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

**需自备的仪器和用品：**

紫外分光光度计、1mL石英比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、超声破碎仪、研钵/匀浆器、乙醇（>98%，AR）、冰和蒸馏水。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

- 1、组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆。10000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、细胞或细菌样本的制备：先收集细胞或细菌样本到离心管内，弃上清，按照每 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）。10000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

**二、测定步骤**

- 1、紫外分光光度计预热30min，波长调至270nm，蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：取10μL 20μmol/mL的标准溶液，加入3990μL提取液，充分混匀，配制0.05μmol/mL标准液使用，现用现配。（实验中每管需要1000μL，为减小实验误差，故配制大体积。）
- 3、对照管样本处理：吸取0.1mL样本于1.5mLEP管中作为对照管，沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖），冷却至





常温待测。

#### 4、加样表（在1.5mLEP管中分别加入）

| 试剂名称（μL）                                                                                                                                  | 测定管 | 对照管      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| 提取液                                                                                                                                       | 850 | 850      |
| 试剂一                                                                                                                                       | 50  | 50       |
| 样本                                                                                                                                        | 100 | 100（已灭活） |
| 混匀，置于40℃水浴锅中准确反应10min，立即沸水浴5min（缠封面膜，防止爆盖），冰浴冷却至常温。10000rpm，室温离心10min，取上清液待测。                                                             |     |          |
| 上清液                                                                                                                                       | 50  | 50       |
| 提取液                                                                                                                                       | 950 | 950      |
| 充分混匀后测定 270nm 下的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照，计算 $\Delta A$ 测定=A 对照-A 测定。另取 1000μL 标准液于 1mL 石英比色皿中，测定 270nm 处的吸光度，记为 A 标准。每个测定管需设一个对照管。标准管只需测 1-2 次。 |     |          |

### 三、单宁酶活力计算

#### 1、按蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟减少1nmol PG的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{单宁酶 (U/mg prot)} &= \Delta A \text{测定} \div (\text{A标准} \div \text{C标准}) \times 1000 \times F \times V \text{酶促} \div (V \text{样本} \times C \text{pr}) \div T \\ &= 1000 \times \Delta A \text{测定} \div \text{A标准} \div C \text{pr}\end{aligned}$$

#### 2、按样本质量计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟减少1nmol PG的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{单宁酶 (U/g 质量)} &= \Delta A \text{测定} \div (\text{A标准} \div \text{C标准}) \times 1000 \times F \times V \text{酶促} \div (V \text{样本} \times W \div V \text{提取}) \div T \\ &= 1000 \times \Delta A \text{测定} \div \text{A标准} \div W\end{aligned}$$

#### 3、按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：每10<sup>4</sup>个细胞或细菌在反应体系中每分钟减少1nmol PG的酶量定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\text{单宁酶 (U/10}^4 \text{ cell)} &= \Delta A \text{测定} \div (\text{A标准} \div \text{C标准}) \times 1000 \times F \times V \text{酶促} \div (V \text{样本} \times 500 \div V \text{提取}) \div T \\ &= 2 \times \Delta A \text{测定} \div \text{A标准}\end{aligned}$$

C标准：标准溶液的浓度，0.05μmol/mL；F：上清液的稀释倍数，上述反应体系中F=1mL÷0.05mL=20；1000：单位换算系数，1μmol=1000nmol；V样本：加入的样本体积，0.1mL；V酶促：酶促反应总体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；V提取：提取液体积，1mL；500：500万个细胞；T：反应时间，10min。

#### 注意事项：

如果A测定大于1.5，可以适当加大稀释倍数，保证总体积1mL不变，如20μL上清液和980μL提取液（相当于F=1000/20=50），计算公式中需改变F和V上清液的数值。

#### 实验实例：

- 取 0.1g 玉兰叶加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算  $\Delta A$  测定=A 对照-A 测定=1.126-1.033=0.093，按样本质量计算酶活得：

$$\text{单宁酶 (U/g 质量)} = 1000 \times \Delta A \div \text{A 标准} \div W = 1000 \times 0.093 \div 0.609 \div 0.1 = 1527.09 \text{ U/g 质量}。$$

#### 相关系列产品：

- BC1360/BC1365 尿酸（UA）含量检测试剂盒
- BC1340/BC1345 植物总酚（TP）含量检测试剂盒
- BC1330/BC1335 植物类黄酮含量检测试剂盒

