

单宁酶活性检测试剂盒说明书

微量法

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：BC4075

规格：100T/48S

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 120 mL×1 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

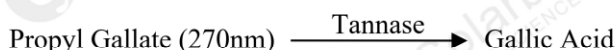
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前取 1 支加入 1 mL 无水乙醇混匀溶解，用不完的试剂可以 2-8℃保存一周；（1 支粉剂溶解后可做 100T，为了延长使用时间，此产品多给 1 支粉剂）
- 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/酶标仪、微量石英比色皿/96孔UV板、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/酶标仪预热 30min，波长调至 270nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。
- 2、标准液的稀释：取 5μL 20μmol/mL 的标准溶液，加入 1995μL 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200μL，为减小实验误差，故配制大体积。）

3、对照管样本处理：吸取0.02mL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	170	170
试剂一	10	10
样本	20	20（已灭活）
混匀，置于40℃水浴锅中准确反应10min，立即沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖），冰浴冷却至常温。10000rpm，室温离心10min，取上清待测。		
上清液	10	10
提取液	190	190
充分混匀后测定 270nm 处的吸光度，分别记为 A 测定、A 对照，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。另取 200μL 标准液于微量石英比色皿/96 孔 UV 板中，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。

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

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。

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

3、按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：每10⁴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。

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

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 $F = 200\mu\text{L} \div 10\mu\text{L} = 20$ ；1000：单位换算系数，1μmol=1000nmol；V样本：加入的样本体积，0.02mL；V酶促：酶促反应总体积，0.2mL；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0.2mL不变，如5μL上清液和195μL提取液（相当于 $F = 200/5 = 40$ ），计算公式中需改变F和V上清液的数值。

实验实例：

1. 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，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}} = 0.6631 - 0.6258 = 0.0373$ ，按样本质量计算酶活得：



单宁酶 (U/g 质量) = $1000 \times \Delta A \div A_{\text{标准}} \div W \times F$ (稀释倍数) = 1119 U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] He Q, Guo K, Wang L, Xie F, Zhao Q, Jiang X, He Z, Wang P, Li S, Huang Y, Zhang C, Huang R, Liu Y, Wang F, Zhou X, Niu R, Zuo T, Wang Y, Li C. Tannins amount determines whether tannase-containing bacteria are probiotic or pathogenic in IBD. Life Sci Alliance. 2023 Feb 9;6(5): e202201702. doi: 10.26508/lisa.202201702. PMID: 36759174; PMCID: PMC9911794.

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

