

单宁酶活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1857

产品规格：100T/48S

产品简介：

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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体120mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×2支	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂一：临用前取1支加入1mL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：5mg没食子酸丙酯。临用前加入1.178mL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。

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、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5 μL 20 μmol/mL的标准溶液，加入1995 μL提取液，充分混匀，配制成0.05 μmol/mL标准液使用，现用现配。（实验中每管需要200 μL，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，冷却至常温待测。
4. 加样表（在1.5mLEP管中分别加入）



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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, 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 ΔA 测定=A 对照-A 测定。另取 200 μL 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、单宁酶活性计算

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。

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

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 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。

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

C 标准: 标准溶液的浓度, 0.05 μmol/mL; F: 上清液的稀释倍数, 上述反应体系中 F=200 μL ÷ 10 μL=20; 1000: 单位换算系数, 1 μmol=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 5 μL 上清液和 195 μL 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 ΔA 测定=A 对照管-A 测定管=0.6631-0.6258=0.0373, 按样本质量计算酶活得:

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com