



## 单宁酶活性检测试剂盒 Tannase Assay Kit

微量法

产品编号: AK360M

产品规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK360-A	120mL× 1 瓶	2-8℃保存;
AK360-B	粉剂×1 支	2-8℃保存; 临用前每支加入 6mL 无水乙醇, 充分溶解后备用; 剩余试剂 4℃可保存一周;
AK360-标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存; 临用前加入 1.178 mL 无水乙醇充分混匀溶解, 配成 10 μmol/mL 的标准溶液。

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

### 简介:

意义: 单宁酶全称是单宁酯酰水解酶(Tannase, EC 3.1.1.20), 它可以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。

原理: 使用抗氧化剂没食子酸丙酯 (PG) 作为单宁酶酶促反应的底物, 在 270nm 下测定底物 PG 反应前后的吸光度变化, 计算单宁酶酶活力。

### 自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 (UV 板)、研钵、冰、蒸馏水。

### 粗酶液提取:

1. 组织: 按照组织质量 (g) : AK360-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK360-A), 进行冰浴匀浆。10000g 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 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次)。10000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

### 测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长到 270 nm, 蒸馏水调零。
2. 将 10μmol/mL 的标准溶液用提取液稀释为 0.05μmol/mL 的标准溶液, 测定其在 270nm 下的吸光度, 记为 A 标准 (标准管只需测定 1-2 次)。
3. 吸取 0.02mL 样本于 1.5mL EP 管中作为对照管, 沸水浴 5min, 冷却至常温。
4. 操作表:

试剂名称 (μL)	对照管 (μL)	测定管 (μL)
提取液	170	170
95℃水浴 5min 后灭活的粗酶液	20	
粗酶液		20
AK360-B	10	10
混匀, 40℃准确保温 10 min 后, 置 95℃水浴中 10 min (盖紧, 防止水分		

散失)，冷却后常温 10000rpm 离心 10min，取上清；		
上清液	10	10
AK360-A	190	190
混匀，取 200uL 至微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中，270nm 处读取各管吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ ；每个测定管需设一个对照管。		

#### TAN 活力单位的计算：

##### 1. 按照蛋白浓度计算

单位的定义：40℃下每毫克蛋白每分钟水解减少 1nmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

$TAN \text{ 活性}(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (A_{\text{标准}} - C_{\text{标准}}) \times 1000 \times F \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1000 \times \Delta A \div A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

##### 2. 按照样本鲜重计算

单位的定义：40℃下每克样品每分钟水解减少 1nmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

$TAN \text{ 活性}(U/g \text{ 质量}) = \Delta A \div (A_{\text{标准}} - C_{\text{标准}}) \times 1000 \times F \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样本}} \times W \div V_{\text{提取}}) \div T = 1000 \times \Delta A \div A_{\text{标准}} \div W$

##### 3. 按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：40℃下每  $10^4$  个细胞或细菌每分钟水解减少 1nmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

$TAN \text{ 活性}(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (A_{\text{标准}} - C_{\text{标准}}) \times 1000 \times F \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样本}} \times 500 \div V_{\text{提取}}) \div T = 2 \times \Delta A \div A_{\text{标准}}$

C 标准：标准溶液的浓度，0.05 $\mu\text{mol/mL}$ ；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，1 $\mu\text{mol} = 1000\text{nmol}$ ；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：

- 可以在不同对照管中加入不同样品的粗酶液，然后集中进行 5min 95℃沸水浴处理。
- 务必使用 96 孔 UV 板（非普通酶标板，普通酶标板只能透过可见光，不能透过紫外光）。
- 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 $\mu\text{L}$  上清液和 195 $\mu\text{L}$  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。