



单宁酶活性检测试剂盒

Tannase Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK360U

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK360-A	50mL×1 瓶	2-8℃保存;
AK360-B	粉剂×1 支	2-8℃保存; 临用前每支加入 3mL 无水乙醇, 充分溶解后备用; 剩余试剂 2-8℃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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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 0.1mL 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	850	850
95℃水浴 5min 后灭活的粗酶液	100	
粗酶液		100
AK360-B	50	50
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	50	50
AK360-A	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 ΔA 测定=A 对照-A 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)。

$TAN \text{ 活性}(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (A \text{ 标准} \div C \text{ 标准}) \times 1000 \times F \times V \text{ 酶促} \div (V \text{ 样本} \times Cpr) \div T = 1000 \times \Delta A \div A \text{ 标准} \div Cpr$

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)。

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

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)。

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

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 $F=1\text{mL} \div 0.05\text{mL}=20$ ；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：

- 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℃水浴处理。
- 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。