Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd
Tel: 400-968-6088
Fax: 010-56371281
Http://www.solarbio.com

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：

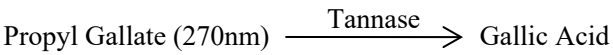
1、 试剂一：临用前取 1 支加入 1.5 mL 无水乙醇混匀溶解，用不完的试剂可以 2-8℃保存一周；

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270nn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。

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、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，配制成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，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，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 ΔA 测定=A 对照-A 测定。另取 1000μL 标准液于石英比色皿中，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。

单宁酶（U/mg prot）=ΔA测定÷（A标准÷C标准）×1000×F×V酶促÷（V样本×Cpr）÷T

=1000×ΔA测定÷A标准÷Cpr

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。

单宁酶（U/g 质量）=ΔA测定÷（A标准÷C标准）×1000×F×V酶促÷（V样本×W÷V提取）÷T

=1000×ΔA测定÷A标准÷W

3、按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：每10^4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。

单宁酶（U/10^4 cell）=ΔA测定÷（A标准÷C标准）×1000×F×V酶促÷（V样本×500÷V提取）÷T

=2×ΔA测定÷A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=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：

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，测得计算 ΔA 测定=A 对照-A 测定=1.126-1.033=0.093，按样本质量计算酶活得：

单宁酶（U/g 质量）=1000×ΔA÷A 标准÷W=1000×0.093÷0.609÷0.1=1527.09 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