



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 AK360-A, 充分溶解后备用; 剩余试剂 4℃保存;
AK360-标准品	粉剂×1支	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

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. 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, 配制成 0.05μmol/mL 标准液使用, 现用现配。
3. 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
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 μ L 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。		

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 $^{\circ}$ C 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，检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板）。

TAN 活力单位的计算：

1. 按照蛋白浓度计算

单位的定义：40 $^{\circ}$ C 下每毫克蛋白每分钟水解减少 0.01 μ mol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

2. 按照样本鲜重计算

单位的定义：40 $^{\circ}$ C 下每克样品每分钟水解减少 0.01 μ mol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

3. 按细胞或细菌数量计算：

单位的定义：40 $^{\circ}$ C 下每 10⁴ 个细胞或细菌每分钟水解减少 0.01 μ mol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

C 标准：标准溶液的浓度，0.05 μ 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 μ mol=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。