

单宁酶 (Tannase) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1060

保存: 4°C 避光保存 12 个月

规格: 48T/96T

检测范围: 0.3125–20 $\mu\text{mol/mL}$ (标准品浓度)

灵敏度: 0.156 $\mu\text{mol/mL}$ (标准品浓度)

适用样本: 植物组织、真菌、细菌

产品简介

单宁酶, 又称鞣酸酶, 全称是单宁酰基水解酶 (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, 它可以水解酯键和缩酚羧键, 生成没食子酸和葡萄糖。该酶可由霉菌, 如黑曲霉、米曲霉生产。可用于处理啤酒中单宁、蛋白质, 使其澄清透明, 亦可用于除去柿子等品的涩味, 以及用于制造速溶茶, 防止发酵茶混浊。本试剂盒可检测生物体内单宁酶含量, 其原理是使用没食子酸丙酯 (PG) 作为单宁酶酶促反应的底物, 其在 270nm 处有特征吸收峰, 测定反应前后 270nm 处的吸光值变化, 计算单宁酶酶活力。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
试剂一	100mL	100mL \times 2	4°C 保存
试剂二	5mL	10mL	4°C 避光保存
标准品	1	2	4°C 避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计 (能测 270nm 处的吸光度)
水浴锅、制冰机、低温离心机
96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
无水乙醇
匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 避光保存。

标准品: 临用前每管加入 1.178 mL 无水乙醇充分混匀溶解, 配制成 20 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准品溶液备用。用不完的试剂可 4°C 保存一周或 -20°C 长期保存。

标准曲线设置: 按下表所示用试剂一将 20 $\mu\text{mol/mL}$ 标准品稀释为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.313 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液。

	标准品体积	试剂一体积 (μL)	标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
Std. 1	200 μL of 20 $\mu\text{mol/mL}$	0	20
Std. 2	100 μL of Std. 1 (20 $\mu\text{mol/mL}$)	100	10
Std. 3	100 μL of Std. 2 (10 $\mu\text{mol/mL}$)	100	5

产品说明书

Std. 4	100 μ L of Std. 3 (5 μ mol/mL)	100	2.5
Std. 5	100 μ L of Std. 4 (2.5 μ mol/mL)	100	1.25
Std. 6	100 μ L of Std. 5 (1.25 μ mol/mL)	100	0.625
Std. 7	100 μ L of Std. 6 (0.625 μ mol/mL)	100	0.313

注意：标准品尽量现配现用，稀释后的标准品不宜长久放置。

样本制备

植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，10,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

真菌或细菌：收集 500 万真菌或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞或细菌，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，冰浴超声波破碎真菌或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 10,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。处理好的样本须当天检测。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 270nm。紫外分光光度计去离子水调零。
2. 吸取 50 μ L 样本于 EP 管中作为对照管，沸水浴 5min，冷却至常温。
3. 样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白管 (μ L)	标准管 (μ L)	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)
试剂一	200	150	100	100
不同浓度标准品	0	50	0	0
样本	0	0	50	50（已灭活）
试剂二	0	0	50	50

混匀后 40℃水浴反应 10min 后马上沸水浴 5min，冷却后常温（25℃）10,000g 离心 10min，取上清。

在 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿中分别加入下列试剂：

上清液	10	10	10	10
试剂一	190	190	190	190

4. 混匀后测定 270nm 下的吸光度，分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 和 $A_{\text{对照}}$ ，计算 $\Delta A_{\text{标}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。（空白管只需做 1 次，每个样本都需要设置一个对照）。

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 $\Delta A_{\text{测}}$ 大于 2.0，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数；如果 $\Delta A_{\text{测}}$ 小于 0.001，可增加样本量进行检测。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴， $\Delta A_{\text{标}}$ 为 x 轴绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。将 $\Delta A_{\text{测}}$ 带入标准曲线公式计算出 y（ μ mol/mL）。

2. 样本单宁酶含量计算

（1）按样本质量计算

单位的定义：40℃下，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) = $y \times 1,000 \times F \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times n = 8,000 \times y \div W \times n$

（2）按真菌或细菌的细胞数量计算

单位的定义：40℃下，每 10^4 个细胞的真菌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。

产品说明书

单宁酶 (U/10⁴ cells) = $y \times 1,000 \times F \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times n = 16 \times y \times n$

(3) 按蛋白浓度计算

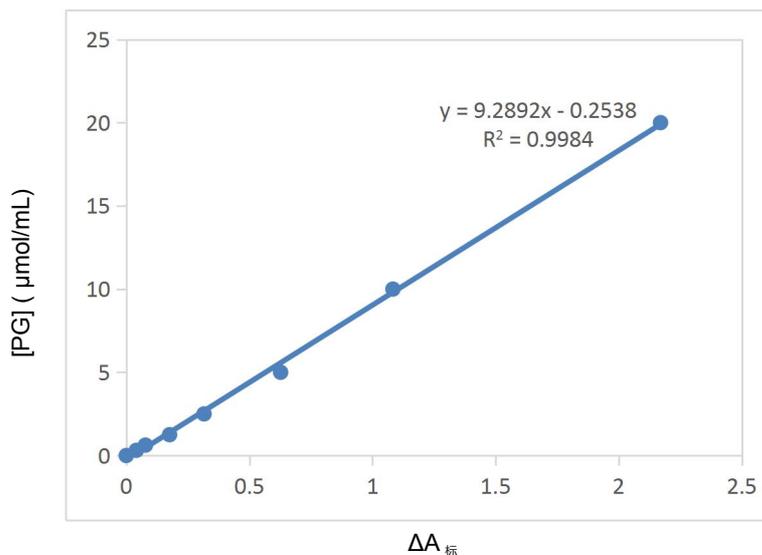
单位的定义: 40℃下, 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟减少 1 nmol PG 的酶量定义为一个酶活性单位。

单宁酶 (U/mg prot) = $y \times 1,000 \times F \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T \times n = 8,000 \times y \div Cpr \times n$

1,000: 单位换算系数, 1 μmol=1,000nmol; F: 上清液的稀释倍数, 上述反应体系中 F=200 μL ÷ 10 μL=20; V_{反总}: 反应体系总体积, 0.2mL; W: 样本质量, 0.1g; V_样: 加入样本体积, 0.05mL; V_{样总}: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 10min; n: 样本进一步稀释的稀释倍数; 500: 500 万个细胞数量的真菌或细菌; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1059 单宁检测试剂盒 (微量法)

PMK1053 植物类黄酮检测试剂盒 (微量法)

PMK1054 植物总酚 (TP) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1055 植物原花青素 (OPC) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

