

单宁酶活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHD4-M48	单宁酶活性检测试剂盒	48T	微量法
PYHD4-M96		96T	

一、测定意义

单宁酶又称单宁酯酰水解酶，是对酯基具有专一性催化活性的水解酶，能够水解没食子酸单宁的酯键和缩酚羧键生成没食子酸和葡萄糖，在酿酒、饲料加工、化妆品和食品领域具有重要的应用价值。

二、测定原理

以没食子酸丙酯（PG）作为反应的底物，单宁酶分解 PG 产生的没食子酸可与绕单宁在碱性条件下形成红色复合物，该复合物在 520nm 处有最大吸收，从而可计算出单宁酶的活力。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（48T）	试剂装量（96T）	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 2 mL×1 瓶	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
	使用前每瓶粉剂中加入 2mL 试剂一，加热助溶，现配现用。		
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
	使用前每瓶粉剂中加入 2mL 甲醇（自备）溶解，现用现配。		
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	液体 4 mL×1 瓶	2-8℃保存

四、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）

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 520nm，蒸馏水调零；
- 2、试剂二使用时需要 37℃ 预热 10min 后使用；
- 3、操作表（在 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	对照管	空白管
上清液 (μL)	10	-	-
提取液 (μL)	-	-	10
试剂二 (μL)	10	10	10
混匀, 37℃水浴 5min			
试剂三 (μL)	10	10	10
混匀, 37℃水浴 5min			
试剂四 (μL)	10	10	10
混匀, 37℃水浴 5min			
上清液 (μL)	-	10	-
蒸馏水 (μL)	160	160	160
充分混匀, 测定 520 nm 处吸光值, 记为 A 测定、A 对照、和 A 空白; 计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$, $\Delta A_{\text{对照}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$, $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$ 。 注: 每个样品均需设一个对照管, 空白管只需测定 1-2 次。			

五、单宁含量的计算：

1、按样本质量计算：

酶活定义：每克样品每分钟水解没食子酸丙酯产生 1μmol 没食子酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{单宁酶活性 (U/g)} = \Delta A \times \text{反总} \div \epsilon \div d \times 10^6 \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.8 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克蛋白每分钟水解没食子酸丙酯产生 1μmol 没食子酸所需的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{单宁酶活性 (U/mg prot)} = \Delta A \times \text{反总} \div \epsilon \div d \times 10^6 \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.8 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

ε: 没食子酸摩尔消光系数: 10000L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 反总: 反应总体积, 2×10⁻⁴L; V 样: 反应中样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度需自行测定; W, 样本质量, g; T: 反应时间, 5min。
10⁶: 单位换算系数, 1mol=10⁶μmol。

六、注意事项：

- 1、若测定吸光值超出标准线性吸光值范围：高于最高值建议将待测样本使用提取液适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当增加样本量或调整提取液加入量重新提取后再进行测定，计算时相应修改；
- 2、样本蛋白浓度测定需使用 PBS 单独提取后再进行测定；

3、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。