

## 单宁含量试剂盒说明书

(货号: BP10038W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

单宁是一类水溶性、分子量在 500-3000 Da 之间的酚类化合物。在植物界中广泛分布,是一种重要的次级代谢产物,也是除木质素以外含量最多的一类植物酚类物质,具有抗氧、保湿、防腐等作用。

单宁类化合物在碱性溶液中,将磷钼酸还原成蓝色化合物,于 650nm 处测定吸光值,蓝色的深浅程度与单宁含量成正比。

### 二、试剂盒组分与配制:

| 试剂组分 | 试剂规格       | 存放温度   | 注意事项                                                         |
|------|------------|--------|--------------------------------------------------------------|
| 试剂一  | 液体 4mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |                                                              |
| 试剂二  | 液体 6mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                              |
| 标准品  | 粉剂 1 支     | 4℃避光保存 | 1. 若重新做标曲,则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。 |

### 三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### ① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g),加入 1mL 蒸馏水,充分匀浆后转移到 EP 管中,80℃水浴提取 1h,12000rpm,4℃离心 10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取

##### ② 液体样品:

澄清的液体样本可直接检测;若浑浊可离心后取上清液检测。

##### ③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 的蒸馏水,超声波破碎细菌或细胞(冰浴,功率 200W,超声 3s,间隔 10s,重复 30 次),12000rpm,离心 10min,取上清置冰上待测。

#### 2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上(等待仪器过自检程序亦可),调节波长至 650nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

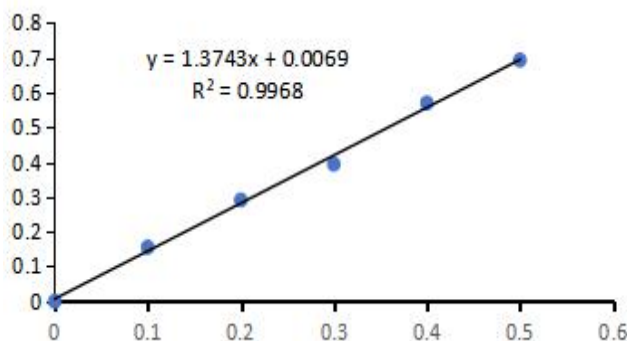
| 试剂组分 (μL) | 测定管 | 空白管 (仅做一次) |
|-----------|-----|------------|
| 样本        | 10  |            |
| 蒸馏水       | 130 | 140        |
| 试剂一       | 40  | 40         |
| 试剂二       | 60  | 60         |

充分混匀，室温静置 30min，于 650nm 处读取吸光值 A，  
 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。

【注】：试剂一和试剂二可以用排枪加。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程为  $y = 1.3743x + 0.0069$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为  $\Delta A$ 。



2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{单宁含量(mg/g 重量)} &= [(\Delta A - 0.0069) \div 1.3743 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.7276 \times (\Delta A - 0.0069) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{单宁含量(mg/mg prot)} &= [(\Delta A - 0.0069) \div 1.3743 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.7276 \times (\Delta A - 0.0069) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

$$\text{单宁含量(mg/mL 液体)} = [(\Delta A - 0.0069) \div 1.3743 \times V1] \div V1 \times D = 0.7276 \times (\Delta A - 0.0069) \times D$$

2、按细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{单宁含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0069) \div 1.3743 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.7276 \times (\Delta A - 0.0069) \div 500 \times D \end{aligned}$$

V---提取液的总体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

W---样品质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

500---细菌或细胞总数，万

Cpr---样本蛋白浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，也可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：标准管用前甩几下或离心使粉体落入底部，再加 1mL 蒸馏水混匀溶解；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5 mg/ml，也可根据实际样本调整标准品浓度；

4 标品稀释参照表如下：

| 吸取标准品母液 500uL，加入 500μl 蒸馏水，混匀得到 0.5 mg/ml 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓 mg/mL                                           | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 标品稀释液 uL                                            | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 蒸馏水 uL                                              | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                           |     |     |     |     |     |     |

5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂组分 (μL)                                                              | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                     | 10  |              |
| 蒸馏水                                                                    | 130 | 140          |
| 试剂一                                                                    | 40  | 40           |
| 试剂二                                                                    | 60  | 60           |
| 充分混匀，室温静置 30min，于 650nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |              |