

# 单宁酶 (Tannase, TAN) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

**测定意义：**

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。

**测定原理：**

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 反应前后的光密度变化,计算单宁酶酶活力。

**需自备的的仪器和用品：**

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

**试剂的组成和配制：**

试剂一：液体 100mL×2 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 支，4℃保存；临用前每支加入 6mL 试剂一，充分溶解后备用；用不完的试剂 4℃保存；

**粗酶液提取：**

按照组织质量 (g)：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

液体样本：直接取上清测定。

**测定步骤：**

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 270 nm，蒸馏水调零。

2、加样表

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
95℃水浴 5min 后灭活的粗酶液	50	
粗酶液		50
试剂二	50	50

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

试剂一	900	900
-----	-----	-----

混匀，取 200uL 至微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中，270nm 处读取各管吸光值。计算  $\Delta A=A_{\text{对照}}-A_{\text{测定}}$ 。每个测定管需设个一个对照管。

**注意:**

- 1.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°C沸水浴处理。
- 2.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**

**a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

标准条件下测定回归方程为  $y = 0.0058x + 0.0044$ ,  $R^2 = 0.9994$ ;  $x$  为 PG 含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ),  $y$  为吸光值。

1、按样本体积计算

单位的定义: 40°C下每毫升粗酶液每分钟水解减少 0.01 $\mu\text{mol}$  底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0058 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 34.48 \times (\Delta A - 0.0044) \end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算

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

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0058 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 34.48 \times (\Delta A - 0.0044) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按照样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0058 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 34.48 \times (\Delta A - 0.0044) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 1mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.05mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $T$ : 反应时间, 10min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g。

**b.用 96 孔板测定的计算公式如下**

标准条件下测定回归方程为  $y = 0.0029x + 0.0044$ ,  $R^2 = 0.9994$ ;  $x$  为 PG 含量 ( $\mu\text{mol/L}$ ),  $y$  为吸光值。

1、按样本体积计算

单位的定义: 40°C下每毫升粗酶液每分钟水解减少 0.01 $\mu\text{mol}$  底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0029 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 68.97 \times (\Delta A - 0.0044) \end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算

单位的定义: 40°C下每毫克蛋白每分钟水解减少 1 $\mu\text{mol}$  底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0029 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 68.97 \times (\Delta A - 0.0044) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按照样本鲜重计算

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

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0029 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 68.97 \times (\Delta A - 0.0044) \div W \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 1mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.05mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $T$ : 反应时间, 10min;  $\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;  $W$ : 样本质量, g。