

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 200μL 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℃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℃下每毫升粗酶液每分钟水解减少 0.01 μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位。

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

2、按照蛋白浓度计算

单位的定义：40℃下每毫克蛋白每分钟水解减少 0.01 μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

3、按照样本鲜重计算

单位的定义：40℃下每克样品每分钟水解减少 0.01 μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； C_{pr} ：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℃下每毫升粗酶液每分钟水解减少 0.01 μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

2、按照蛋白浓度计算

单位的定义：40℃下每毫克蛋白每分钟水解减少 1 μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

3、按照样本鲜重计算

单位的定义：40℃下每克样品每分钟水解减少 0.01 μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g。