

单宁酶 (Tannase, TAN) 试剂盒说明书

微量法100管/48样

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：

- 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。
- 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:  $40^\circ\text{C}$ 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:  $40^\circ\text{C}$ 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:  $40^\circ\text{C}$ 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:  $40^\circ\text{C}$ 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:  $40^\circ\text{C}$ 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:  $40^\circ\text{C}$ 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.

---

[www.affandi-e.com](http://www.affandi-e.com)