

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。

自备仪器和用品：

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°C保存；

试剂二：粉剂×1支，4°C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°C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°C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°C水浴5min后灭活的粗酶液	50	
粗酶液		50
试剂二	50	50

混匀，40°C准确保温10 min后，置95°C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 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

单宁酶（Tannase, TAN）试剂盒说明书注意：

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 μmol 底物PG所需要的酶量定义为一个酶活单位。

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

$$= 34.48 \times (\Delta A - 0.0044)$$

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 μmol 底物PG所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

$$= 34.48 \times (\Delta A - 0.0044) \div C_{\text{pr}}$$

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 μmol 底物PG所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

$$= 34.48 \times (\Delta A - 0.0044) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ ：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°C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)。

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

$$= 68.97 \times (\Delta A - 0.0044)$$

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 μmol 底物PG所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

$$= 68.97 \times (\Delta A - 0.0044) \div C_{\text{pr}}$$

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 μmol 底物PG所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

$$= 68.97 \times (\Delta A - 0.0044) \div W$$

$V_{\text{反总}}$ ：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.

www.pyram.cn