

**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°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°C 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°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。

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

### 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 0.01μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

### 3、按照样本鲜重计算

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

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

V 反总：反应体系总体积，1mL； V 样：加入样本体积，0.05mL； V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，10min； 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 (μmol/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 0.01μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

#### 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 1μmol 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

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

#### 3、按照样本鲜重计算

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

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

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