

## 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。

### 试剂的组成和配制：

产品名称	OX013-100T/48S	Storage
试剂一：液体	100m×2	4°C
试剂二：粉剂	1 支	4°C
说明书	一份	

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。

### 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

### 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, 调节波长至 270nm, 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	

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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 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  $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

### 注意事项：

- 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。

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

##### 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)。

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

##### 3、按照样本鲜重计算

单位的定义：40°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 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 ( $\mu\text{mol/L}$ )，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)。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



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

### 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)。

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

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。

