

## 单宁酶 (Tannase, TAN) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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	OX014-50T/24S	Storage
试剂一: 液体	100ml	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 3ml 试剂一, 充分溶解后备用; 用不完的试剂 4°C保存;

### 自备仪器和用品:

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 ml 石英比色皿、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。

### 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	
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



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，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。

### TAN 活力单位的计算：

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)。

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

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

