

单宁酶（Tannase, TAN）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

注 意：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、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

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1 支，4℃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℃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。

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，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。

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℃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。

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

2、按照蛋白浓度计算

单位的定义：40℃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)。

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

3、按照样本鲜重计算

单位的定义：40℃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)。

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

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。