



单宁酶活性检测试剂盒

Tannase Assay Kit

紫外分光光度计

产品编号: AK360U

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK360-A	100mL× 1 瓶	2-8℃ 保存;
AK360-B	粉剂×1 支	2-8℃ 保存; 临用前每支加入 3mL AK360-A, 充分溶解后备用; 剩余试剂 4℃ 保存;
AK360-标准品	粉剂×1 支	临用前加入 1.178 mL 无水乙醇充分混匀溶解, 配成 20 μmol/mL 的标准溶液; 2-8℃ 保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

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, 计算单宁酶活力。

自备用品:

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) : AK360-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK360-A), 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. 标准液的稀释: 取 5μL 20μmol/mL 的标准溶液, 加入 1995μL 提取液, 充分混匀, 配制成 0.05μmol/mL 标准液使用, 现用现配。
3. 操作表:

试剂名称 (μL)	对照管 (μL)	测定管 (μL)
提取液	850	850
95℃水浴 5min 后灭活的粗酶液	100	
粗酶液		100
AK360-B	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), 冷却冷却后常温 10000rpm 离心 10min, 取上清		
上清液	50	50
AK360-A	950	950
混匀, 270nm 处读取各管吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。分别记为 A 测定、A 对照, 计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ 。另取标准液于 1 mL 石英比色皿中, 测定 270nm 处的吸光度, 记为 A 标准。每个测定管需设一个对照管。标准管只需测 1-2 次。		

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°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。

$$\text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0044) \div 0.0058 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div V_{\text{样}} \div T = 17.24 \times (\Delta A - 0.0044)$$

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 $0.01\mu\text{mol}$ 底物 PG 所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

$$\text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0044) \div 0.0058 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 17.24 \times (\Delta A - 0.0044) \div \text{Cpr}$$

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)。

$$\begin{aligned} \text{TAN 活性}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0044) \div 0.0058 \div 1000 \times V_{\text{反总}} \div 0.01 \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 17.24 \times (\Delta A - 0.0044) \div W \end{aligned}$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 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。