

多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO）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：

PPO（EC1.10.3.1）主要存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，是一种含铜的氧化酶，能使一元酚和二元酚氧化产生醌，从而引起褐化，与果蔬加工、茶叶品质和组培等密切相关。

测定原理：

PPO能够催化邻苯二酚产生醌，后者在525nm有特征光吸收。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：5mL×1瓶，4℃保存；

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、血清（浆）或果汁样本的处理：

按照血清（浆）或果汁体积（mL）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议取0.1mL血清（浆）或果汁加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至525nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定（在EP管中依次加入下列试剂）

试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	50	
煮沸的样本		50
试剂一	200	200

试剂二	50	
蒸馏水		50

37°C(哺乳动物)或25°C(其它物种)中准确水浴10min后, 95°C水浴5min, 冷却至室温, 10000g, 25°C离心10min, 收集上清, 取200μL至微量石英比色皿或96孔板中, 525nm处检测测定管和对照管吸光度, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

注意: 煮沸样本的操作: 取300μL离心上清于EP管中, 进行5min 95°C水浴处理; 每个测定管需要设一个对照管, 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水浴处理。

PPO活性计算:

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清(浆)或果汁PPO活性

单位的定义: 每分钟每mL血清(浆)或果汁在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化

0.01为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 60 \times \Delta A \div V_{\text{液}}$$

2、组织、细菌或细胞PPO活性

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化0.01为一个

酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.01 \div T = 60 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每g组织在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化0.01为一个

酶活力单位。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 60 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每分钟每1万个细菌或细胞在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化0.01为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.12 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 0.3mL; V液: 加入血清(浆)或果汁体积, 0.1mL; 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, 10 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、血清(浆)或果汁PPO活性

单位的定义: 每分钟每mL血清(浆)或果汁在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化

0.005为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 120 \times \Delta A \div V_{\text{液}}$$

2、组织、细菌或细胞PPO活性

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每mg组织蛋白在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div 0.005 \div T = 120 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每g组织在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 120 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每分钟每1万个细菌或细胞在每mL反应体系中使525nm处吸光值变化0.005为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/104 cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 0.24 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 0.3mL; V液: 加入血清(浆)或果汁体积, 0.1mL; 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, 10 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万。