

多酚氧化酶(PPO) 试剂盒说明书

(货号: PB1006F24 分光法 24样)

有效期: 3个月

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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体, 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体, 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体, 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 液体, 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

粗酶液提取:

1、细菌、真菌、细胞或组织样品的制备:

细菌、真菌或培养细胞: 先收集细菌、真菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌、真菌或细胞加入 1mL 提取液) 超声波破碎细菌、真菌或细胞 (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、液体样本的处理:

直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

测定步骤:

1、分光光度计预热 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
试剂一	600	600
试剂二	150	150
样本	150	
煮沸的样本		150

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 中准确水浴 10min 后, 迅速放入冰浴中冷却

试剂三	300	300
-----	-----	-----

充分混匀，10000g，25℃离心 10min，取上清，525nm 处检测测定管和对照管吸光度。

PPO 活性计算：

1、组织中 PPO 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每分钟每 mg 组织蛋白在反应体系中使 525nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \frac{\text{反应总体积 (1200}\mu\text{L)}}{\text{样本体积 (150}\mu\text{L)}} \div \frac{\text{反应时间 (10min)}}{0.01} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{蛋白浓度 (mg/mL)} = 80 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{蛋白浓度 (mg/mL)}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每分钟每 g 组织蛋白在反应体系中使 525nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \frac{\text{反应总体积 (1200}\mu\text{L)}}{\text{样本体积 (150}\mu\text{L)}} \div \frac{\text{反应时间 (10min)}}{0.01} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{样本鲜重 (g/mL)} = 80 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{样本鲜重 (g/mL)}$$

2、细菌、真菌或培养细胞中 PPO 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每分钟每 mg 组织蛋白在反应体系中使 525nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \frac{\text{反应总体积 (1200}\mu\text{L)}}{\text{样本体积 (150}\mu\text{L)}} \div \frac{\text{反应时间 (10min)}}{0.01} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{蛋白浓度 (mg/mL)} = 80 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{蛋白浓度 (mg/mL)}$$

(2) 按细菌、真菌或细胞密度计算：

单位的定义：每分钟每 1 万个细菌、真菌或细胞在反应体系中使 525nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{\text{反应总体积 (1200}\mu\text{L)}}{\text{样本体积 (150}\mu\text{L)}} \div \frac{\text{反应时间 (10min)}}{0.01} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{细菌、真菌或细胞密度 (10}^4\text{/mL)} = 80 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) \div \text{细菌、真菌或细胞密度 (10}^4\text{/mL)}$$

3、液体中 PPO 活力的计算：

单位的定义：每分钟每 ml 液体在反应体系中使 525nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/ml)} = \frac{\text{反应总体积 (1200}\mu\text{L)}}{\text{样本体积 (150}\mu\text{L)}} \div \frac{\text{反应时间 (10min)}}{0.01} \times (\text{A 测定} - \text{A 对照}) = 80 \times (\text{A 测定} - \text{A 对照})$$