多酚氧化酶(PPO)试剂盒说明书

（货号：PB1006W48 微量法 48 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/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：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：液体 10mL×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、真菌或细胞数量 （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
试剂一	200	200
试剂二	50	50
样本	50	
煮沸的样本		50

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	100	100

3、充分混匀，5000g，常温离心 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 ΔA=A 测定-A 对照。

PPO 活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

（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。

PPO（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（Cpr×V 样）÷0.01÷T =80×ΔA÷Cpr

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。

PPO（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)÷0.01÷T =80×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每分钟每 1 万个细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。

PPO（U/10^4 cell）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×500)÷0.01÷T =0.16×ΔA

（4）按液体计算

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。

PPO（U/ml）=ΔA×V 反总÷V 样÷0.01÷T =80×ΔA

V 反总：反应体系总体积，400μL； V 样：加入样本体积，50μL；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：样品质量，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）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。

PPO（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（Cpr×V 样）÷0.01÷T =160×ΔA÷Cpr

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。

PPO（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×W)÷0.01÷T =160×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每分钟每 1 万个细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。

PPO（U/10^4 cell）=ΔA×V 反总÷(V 样÷V 样总×500)÷0.01÷T =0.32×ΔA

（4）按液体计算

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。

PPO（U/ml）=ΔA×V 反总÷V 样÷0.01÷T =80×ΔA

V 反总：反应体系总体积，400μL； V 样：加入样本体积，50μL；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：样品质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。