

多酚氧化酶(PPO) 试剂盒说明书

(货号: PB1006W96 微量法 96 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 120mL×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、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 200 μL 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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

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。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div 0.01 \div T = 80 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div 0.01 \div T = 80 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div 0.01 \div T = 0.16 \times \Delta A$$

(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。

$$\text{PPO (U/ml)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 80 \times \Delta A$$

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。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div 0.01 \div T = 160 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div 0.01 \div T = 160 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div 0.01 \div T = 0.32 \times \Delta A$$

(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。

$$\text{PPO (U/ml)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 80 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，400 μ L； V 样：加入样本体积，50 μ L； 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。