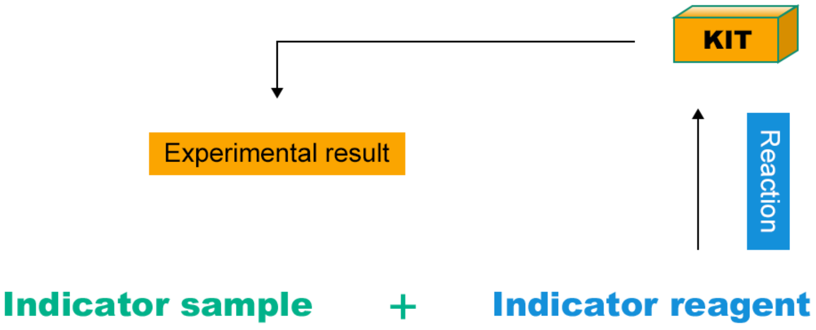
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0346　　Size：100T/48S

多酚氧化酶(PPO）检测试剂盒说明书

微量法

***正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定**

一、测定意义：

PPO（EC1.10.3.1）是一种广泛存在于植物体内的含铜的氧化酶，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。

二、测定原理：

PPO 能够催化邻苯二酚产生邻苯二醌，后者在 410nm 有特征光吸收。

三、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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	用前混匀即可
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	-

五、操作步骤：

1. 粗酶液提取：

1）收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

2）称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

2. 测定步骤：

1）分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 410nm，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，迅速放入沸水中加热 10min		

充分混匀，5000g，常温离心 10min，收集上清，取 200μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，410nm 处检测测定管和对照管吸光度，计算 ΔA=A 测定-A 对照。

注意：每个测定管需要设置一个对照管，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 沸水浴处理。

六、PPO 活性计算：

1. 用微量玻璃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 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

PPO（U/mg prot）= ΔA÷0.01×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T =60×ΔA÷Cpr

2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

PPO（U/g 鲜重）=ΔA÷0.01×V 反总÷（W÷V 样总×V 样）÷T =60×ΔA÷W

3）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义:每分钟每 1 万个细菌或细胞在每mL 反应体系中使410nm 处吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

PPO（U/10^4 cell）=ΔA÷0.01×V 反总÷（500÷V 样总×V 样）÷T =0.12×ΔA

2 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 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

PPO（U/mg prot）=ΔA÷0.005×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T =120×ΔA÷Cpr

2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

PPO（U/g 鲜重）=ΔA÷0.005×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T =120×ΔA÷W

3）按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每分钟每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

PPO（U/10^4 cell）=ΔA÷0.005×V 反总÷（500÷V 样总×V 样）÷T =0.24×ΔA

V 反总：反应体系总体积，0.3mL；V 样：加入反应体系中样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞数量，500 万； T：反应时间，10min。

七、注意事项：

不同样本的多酚氧化酶最佳的反应温度略有差别，可在 25-37℃之间进行调节。