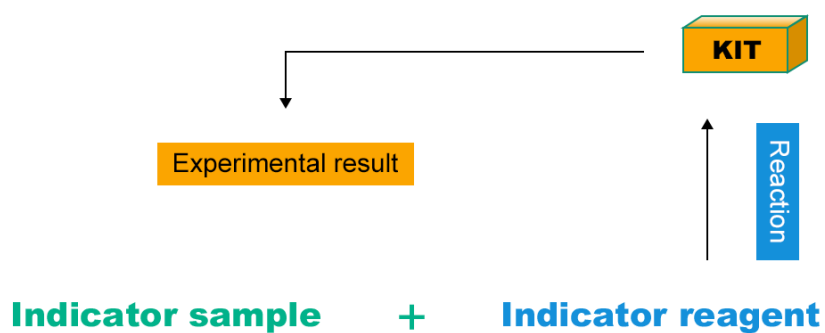


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0619

Size: 50T/24S

多酚氧化酶(PP0) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*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:

PP0 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。

二、测定原理:

PP0 能够催化邻苯二酚产生醌, 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、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。

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 60mL × 1 瓶	4℃保存	用前混匀
试剂一	液体 40mL × 1 瓶	4℃保存	—
试剂二	液体 10mL × 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. 测定操作表：

1) 分光光度计预热 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	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，迅速放入沸水中加热 10min。		

冷却后，5000g，常温离心 10min，收集上清，用蒸馏水调零，410nm 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：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 5 min 沸水浴处理。

六、PPO 活性计算：

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。

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

1) 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。

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

2) 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。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.12 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.9mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.15 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, 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°C 之间进行调节。