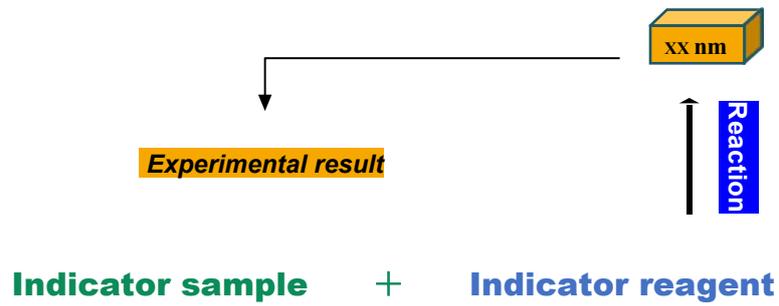


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 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

产品内容：

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	-

产品说明：

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。

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。

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。

操作步骤：

一、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。

二、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 200 μ L 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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

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。

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。

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

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。

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

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。

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

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。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 120 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 120 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.24 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.3mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.05 mL； $V_{\text{样总}}$ ：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。

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。