

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

多酚氧化酶检测试剂盒 (PPO) 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

产品简介：

PPO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。

PPO能够催化邻苯二酚产生醌，后者在525nm有特征光吸收。

试验中所需的仪器和试剂：

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。

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60ml × 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	-

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200万细菌或细胞加入400 μl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0.2g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、测定操作表：

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，迅速放入冰浴中冷却		
试剂三	300	300

充分混匀，5000g，常温离心10min，收集上清，用蒸馏水调零，525nm处检测测定管和对照管吸光度。

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1min沸水浴处理

PPO活性计算:

1、血清、血浆或果汁PPO活性计算

单位定义: 每分钟每毫升样品在每毫升反应体系中使525nm吸光值变化0.01为一个酶活力单位

$$\text{PPO (U/mL)} = (\text{A测定} - \text{A对照}) \times \text{反应总体积} \div (\text{V液} * \times \text{V样} * \div \text{V样总} *) \div 0.01 \div \text{反应时间} \\ = 80 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div \text{V液} *$$

2、组织中PPO活力的计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每分钟每mg组织蛋白在每毫升反应体系中使525nm处吸光值变化0.01定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (1200 } \mu\text{l)} \div \text{样本体积 (150 } \mu\text{l)} \div \text{反应时间 (10min)} \div 0.01 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div \text{蛋白浓度 (mg/ml)} \\ = 80 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div \text{蛋白浓度 (mg/ml)}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每分钟每g组织蛋白在每毫升反应体系中使525nm处吸光值变化0.01定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \text{反应总体积 (1200 } \mu\text{l)} \div \text{样本体积 (150 } \mu\text{l)} \div \text{反应时间 (10min)} \div 0.01 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div \text{样本鲜重 (g/ml)} \\ = 80 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div \text{样本鲜重 (g/ml)}$$

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每毫升反应体系中使525nm处吸光值变化0.01定义为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{反应总体积 (1200 } \mu\text{l)} \div \text{样本体积 (150 } \mu\text{l)} \div \text{反应时间 (10min)} \div 0.01 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div \text{细菌或细胞密度 (10}^4 \text{/ml)} \\ = 80 \times (\text{A测定} - \text{A对照}) \div 500 *$$

*V液: 加入的血清、血浆或果汁的体积

*V样: 加入样本体积

*V样总: 加入提取液体积

*500: 细菌或细胞总数500万