

组织及血液多酚氧化酶（PPO）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHA5-M48	组织及血液多酚氧化酶（PPO）试剂盒	48T	微量法

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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 22 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存

溶液的配制：

1、提取液：临用前将粉剂一倒入提取液中，溶液为悬浊液，使用前需摇匀。

操作步骤：

一、样本处理

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200W，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。

3、血清（浆）：直接检测。若有浑浊请离心后去上清使用。

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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

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本的粗酶液,然后集中进行5min 沸水浴处理。

三、PPO 活性计算

a.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。

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

(2) 按样本质量计算:

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。

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

(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。

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

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。

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

(2) 按样本质量计算:

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。

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

(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。

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

V 反总:反应体系总体积, 0.3mL; V 样:加入反应体系中样本体积, 0.05mL; V 样总:加入提取液体积, 1mL; 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。

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。