

## 多酚氧化酶 (PPO) 试剂盒说明书

(货号: ADS-F-YH005-24 分光法 24样)

有效期: 3个月

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义:

PPO (EC1.10.3.1) 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。测定原理:

PPO 能够催化邻苯二酚产生醌, 后者在 525nm 有特征光吸收。

### 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。

### 试剂组成和配制:

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;

### 粗酶液提取:

#### 1、细菌、真菌、细胞或组织样品的制备:

细菌、真菌或培养细胞: 先收集细菌、真菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌、真菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌、真菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

#### 2、液体样本的处理:

直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

### 测定步骤:

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 525nm, 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, 迅速放入冰浴中冷却

试剂三	300	300
-----	-----	-----

充分混匀, 10000g, 25℃离心 10min, 取上清, 525nm 处检测测定管和对照管吸光度。

### PPO活性计算:

### 1、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。

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

#### (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。

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

### 2、细菌、真菌或培养细胞中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。

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

#### (2) 按细菌、真菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每分钟每1万个细菌、真菌或细胞在反应体系中使525nm处吸光值变化0.01定义为一个酶活力单位。

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

### 3、液体中PPO活力的计算:

单位的定义: 每分钟每ml液体在反应体系中使525nm处吸光值变化0.01定义为一个酶活力单位。

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