

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-YH005-96 微板法 96 样)

一、产品简介:

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, EC 1.10.3.1, PPO)又称酪氨酸酶、儿茶酚酶、酚酶等,是自然界中分布极广的一种含铜氧化酶,普遍存在于植物、真菌、昆虫的质体中。植物受到机械损伤和病菌感染后,PPO 催化酚与 O₂ 氧化形成醌,使组织形成褐变以便损伤恢复,防止或减少感染,提高抗病能力,与果蔬食品加工、储藏;茶叶品质和组培等密切相关。

多酚氧化酶 PPO 是一种含铜的氧化酶,能够催化邻苯二酚产生醌,后者在 420nm 有特征光吸收。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求
提取液	液体 110mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C避光保存

三、需自备的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、乙醇和蒸馏水。

四、多酚氧化酶 (PPO) 的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织,加入 1mL 提取液,进行冰浴匀浆,4°C×12000rpm,离心 15min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例进行提取。

② 果实样本(水分含量高的果实):

称取约 1g 果实组织样本,加入经预冷的 5mL 纯乙醇,冰浴匀浆(保证乙醇在整个匀浆液中体积 80%以上),低温(可放冰上或 4°C冰箱)放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清,留沉淀。再向沉淀中加入经预冷的 5mL 纯乙醇混匀,4°C放置 10min; 12000rpm, 4°C离心 5min; 弃上清,留沉淀。最后向沉淀中加入 1mL 经预冷的提取液,涡旋混匀,12000rpm, 4°C离心 10min; 上清液置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):乙醇体积(mL)为 1:5 的比例进行提取。

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测

① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 420nm。

② 所有试剂至室温(25°C)或 25°C水浴 10min,在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	170
试剂二	50
样本	50
混匀,立即在 420nm 处读取 A1 值,5min 后再读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】:1. 试剂一和试剂二可以用排枪加。

2. 若 A2 值大于 1.5,可减少反应时间 T(如 5min 可减至 2min 后读取 A2)或减少样本加

样量 V1 (如减少至 20 μ L, 则试剂一相应增加), 改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

3. 若 ΔA 小于 0.01, 可增加样本量 V1 (如增至 100 μ L, 则试剂一相应减少), 或可延长反应时间 T (如延长到 15min 后读取 A2), 或增加取样质量 W (如由 0.1g 增至 0.2g), 则改变后的 V1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。
4. 若上升趋势不稳定, 可全部加完稳定几分后再读取 A1, 选取一段线性增长范围读取 A2。
5. 若起始值大于 1.5 且 ΔA 小于 0.01, 请直接联系说明书下方技术支持。

五、结果计算:

1、按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每克组织在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位(U)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 400 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每毫克组织蛋白在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位(U)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.01 \div T = 400 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按照液体体积计算:

单位定义: 每分钟每毫升液体在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位(U)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min} / \text{mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.01 \div T = 400 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL;

T---反应时间, 5min;

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。