

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

(货号: ADS-F-YH005-48 分光法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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侵染后, 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度
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℃避光保存

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足的样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 4℃×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℃冰箱) 放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃放置 10min; 12000rpm, 4℃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℃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。

④ 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10⁴): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤

① 可见分光光度计预热 30min 以上 (等仪器过自检程序亦可), 调节波长至 420nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂至室温 (25℃) 或 25℃水浴 10min, 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管
-----------	-----

试剂一	510
试剂二	150
样本	150
混匀, 立即在 420nm 处读取 A1 值, 5min 后再读取 A2 值, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- 【注】**：1.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。
- 2 若 ΔA 小于 0.01，可增加样本量 V1（如增至 300 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。
- 3.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。
- 4.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：

定义：每分钟每克组织在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活单位(U)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.005 \div T = 266.7 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

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 0.005 为一个酶活单位(U)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/\text{mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.005 \div T = 266.7 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按照液体体积计算：

定义：每分钟每毫升液体在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活单位(U)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/\text{mL}) = \Delta A \div V1 \div 0.005 \div T = 266.7 \times \Delta A$$

4、按细菌或细胞数量计算：

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)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.005 \div T = 266.7 \times \Delta A \div 500$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.15mL；

T---反应时间，5min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

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。