

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 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 110mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	液体 5mL×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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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,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 酶标仪预热 30min 以上(等仪器过自检程序亦可),调节波长至 420nm。

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

试剂组分(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)。

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

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)。

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

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)。

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

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)。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div (500 \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 400 \times \Delta A \div 500$$

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；

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。