

多酚氧化酶 (PPO) 测试盒说明书

(货号: A136-1-1 比色法 50T/24 样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否

则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

多酚氧化酶能够催化底物酚产生醌, 后者在 420nm 处有特征性光吸收。

二、测定意义:

PPO 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、茶叶品质等密切相关; 同时酚类物质对病原微生物有抑制和杀伤作用, 具有一定的抗病能力。

三、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 3 个月)

		规格	保存
试剂一	提取液	混悬液, 60mL×1 瓶	4~8℃
试剂二	缓冲液	液体, 40mL×1 瓶	4~8℃
试剂三	基质液	液体, 10mL×1 瓶	避光 4~8℃

注: 试剂一使用前需混均匀才行, 否则会有偏差。

四、自备仪器或用品:

可见分光光度计及 1cm 光径比色皿 (1mL 容量)、离心机、水浴锅 (及沸水浴锅)、可调式移液器、1cm 光径比色皿、研钵、蒸馏水、冰。

五、粗酶液提取:

- 组织样本:** 组织称重 (g): 提取液体积 (mL) 为 1:5 或 1:10 的比例 (例如取 0.2g 组织, 加 1mL 提取液或 0.1g 组织加 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆; 8000 转/分钟常温离心 10min (或 4000 转/分钟离心 10min 后取上清再 4000 转/分钟离心 10min), 取上清待测。
- 血清 (浆) 或果汁样本:** 取血清 (浆) 或果汁体积 (mL): 提取液体积 (mL) 为 1:4 或 1:9 的比例 (例如取 0.2mL 血清 (浆) 或果汁加入 0.8mL 提取液, 或者取 0.1mL 血清 (浆) 或果汁加入 0.9mL 提取液), 涡旋混匀抽提 1min; 8000 转/分钟常温离心 10min (或 4000 转/分钟离心 10min 后取上清再 4000 转/分钟离心 10min), 取上清待测。
- 细菌或培养细胞:** 可用称重法或细胞计数法, 详情参考“**注意事项**”。

六、操作步骤:

	测定管	对照管
粗酶液上清 (μL)	150	150
试剂二 (μL)	600	600
试剂三 (μL)	150	150
反应条件	先在 37℃ 恒温准确孵育 10min, 再取出立即转入沸水浴煮沸 5min。	
沸水浴完均取出冰水或常温水冷却, 10000 转/分钟常温离心 10 分钟, 取上清于波长 420nm, 1cm 光径比色皿, 蒸馏水调零, 分光光度计测定各管吸光度值 A (ΔA=A _{测定} -A _{对照})。		

注: 每个待测样本需设定一个测定管和一个对照管; 用离心管测定时, 最好提前在盖上扎一小孔防止管盖弹开; 分光光度计预热 30min 以上; 假如 ΔA > 0.4 时, 将粗酶液上清稀释一定倍数后再测; 若 ΔA < 0.01, 则需加大样本浓度或延长测定管 37℃ 反应时间 (如 20min 或 30min)。

七、单位定义与计算:

1、血清 (浆) 或果汁样本计算:

单位定义: 每分钟每 mL 血清 (浆) 或果汁在每 mL 反应体系中使在 420nm 处吸光度值变化 0.01 为一

个酶活力单位。

$$\text{PPO 活力 (U/mL)} = \frac{\Delta A}{0.01} \times \frac{V_{\text{提}} + V_{\text{液}}}{V_{\text{液}}} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{V_{\text{反总}}} \div T$$

2、组织样本按样本鲜重计算:

单位定义: 每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使在 420nm 处吸光度值变化 0.01 为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{PPO 活力 (U/组织)} = \frac{\Delta A}{0.01} \times \frac{V_{\text{提}}}{W} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{V_{\text{反总}}} \div T$$

3、组织或细菌 (细胞) 样本按蛋白浓度计算:

单位定义: 每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使在 420nm 处吸光度值变化 0.01 为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{PPO 活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A}{0.01} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{V_{\text{反总}}} \div \text{Cpr}$$

4、细菌或细胞样本按密度计算:

单位定义: 每分钟每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中使在 420nm 处吸光度值变化 0.01 为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{PPO 活力 (U/10}^4 \text{细胞)} = \frac{\Delta A}{0.01} \times \frac{V_{\text{提}}}{q_{\text{细胞}}} \times \frac{V_{\text{反总}}}{V_{\text{样}}} \times \frac{1}{V_{\text{反总}}} \div T$$

以上公式中:

V_提: 提取液总体积, mL;

V_液: 血清 (浆) 或果汁体积, mL;

W: 样本质量, g;

V_{反总}: 反应体系总体积, 0.9mL;

V_样: 取样量, 0.15mL;

T: 37℃ 反应时间, 10min。

Cpr: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

q_{细胞}: 细胞总数, 10⁴ 个;

九、注意事项:

- 细菌或细胞样本前处理: A: 称重法: 提取时可以先取离心管用万分之一天平称重, 再收集细菌或细胞到离心管内, 1000 转/分钟离心 5min 后弃上清, 再次称重, 减去空离心管重量, 再按 2 (mg): 1000 (μL) 或 1 (mg): 1000 (μL) 的比例加入提取液, 超声破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s、间隔 10s, 重复 30 次), 8000 转/分钟 4℃ 离心 10min, 取上清待测, 结果按照组织计算方法计算; B: 细胞个数法: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积为 500~1000:1 的比例 (建议 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 20% 或 200W, 超声 3s、间隔 10s, 重复 30 次); 8000 转/分钟常温离心 10min, 取上清待测
- 本实验组织/细胞样本用试剂一提取很重要, 提取后的粗酶液除了测定蛋白以外, 不能用于测定其他指标, 以防止产生干扰。
- 如样本 PPO 活力较低 (即测定管与对照管差值较小), 可延长测定管 37℃ 反应时间 (如 20min 或 30min), 时间变量代入计算公式计算。