

多酚氧化酶(PPO)活性检测试剂盒说明书

Polyphenol Oxidase Assay Kit

微量法

货号: AK065

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES09	120ml×1	4℃保存, 用前混匀;
AK065-A	20ml×1	4℃保存
AK065-B	5ml×1	4℃避光保存

简介:

意义: 多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, 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。

原理: PPO 能够催化邻苯二酚产生醌, 后者在 410nm 有特征光吸收。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理:

1. 细菌或培养细胞: 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 (10^4 个): 提取液 ES09 体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES09), 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); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织样品: 按照组织质量 (g): 提取液 ES09 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 ES09), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 或果汁样本的处理:
按照血清 (浆) 或果汁体积 (mL): 提取液 ES09 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.1mL 血清 (浆) 或果汁加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 410nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定, 在 EP 管中按照下表操作:

试剂名称	测定管 (ul)	对照管 (ul)
AK065-A	200	200
AK065-B	50	50
待测样本	50	
煮沸的待测样本		50
37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 中准确水浴 10min 后, 95℃ 水浴 5min, 冷却至室温, 10000g, 常温离心 10min, 收集上清, 取 200μL 至微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 410nm 处检测测定管和对照管吸光度, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。		

注意: 每个测定管需要设一个对照管。可以在不同对照管中加入不同样品的粗酶液, 然后集中进行 5min 95℃ 水浴处理。

PPO 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清（浆）或果汁 PPO 活性

单位的定义：每分钟每 mL 血清（浆）或果汁在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 60 \times \Delta A \div V_{\text{液}}$$

2. 组织、细菌或细胞 PPO 活性

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.01 \div T = 60 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）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 410nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 60 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

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 410nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.12 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积，0.3mL；V 液：加入血清（浆）或果汁体积，0.1mL；V 样：加入样本体积，0.05mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，10 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 血清（浆）或果汁 PPO 活性

单位的定义：每分钟每 mL 血清（浆）或果汁在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mL)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{液}} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 120 \times \Delta A \div V_{\text{液}}$$

2. 组织、细菌或细胞 PPO 活性

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 410nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/mg prot)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div 0.005 \div T = 120 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（2）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 410nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/g 鲜重)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 120 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

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 410nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

$$\text{PPO (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 0.24 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积，0.3mL；V 液：加入血清（浆）或果汁体积，0.1mL；V 样：加入样本体积，0.05mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，10 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量(g)；500：细胞或细菌总数，500 万。

蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))。