

多酚氧化酶(PPO) 活性检测试剂盒 (微量法) (本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0100	多酚氧化酶(PPO) 活性检测试剂盒	100 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 100mL ×1 瓶 (使用前混匀)	4°C
试剂一	液体 20mL ×1 瓶	4°C
试剂二	液体 5mL ×1 瓶	4°C

一、产品说明

PPO (EC1.10.3.1) 是一种广泛存在于植物体内的含铜的氧化酶, 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。

PPO 能够催化邻苯二酚产生邻苯二醌, 后者在 410nm 有特征光吸收。

二、自备材料

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。

三、样品准备

- 1、组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10 分钟, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细胞或细菌: 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), 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 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 管中依次加入下列试剂):

试剂名 (μL)	测定管	对照管
试剂一	200	200
试剂二	50	50
样本	50	
煮沸的样本		50

37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 中准确水浴 10min 后, 迅速放入沸水中加热 10min, 充分混匀, 5000g, 常温离心 10min, 收集上清, 取 200 μL 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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

五、PPO 活性的计算

A. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

1、按照组织样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 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 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照组织样本鲜重计算:

单位的定义: 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 定义为一个酶活力单位。

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

3、按照细菌/细胞数量计算:

单位的定义: 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 定义为一个酶活力单位。

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

B. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

1、按照组织蛋白浓度计算:

单位的定义: 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 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照组织鲜重计算

单位的定义: 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 定义为一个酶活力单位。

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

3、按照细菌/细胞数量计算:

单位的定义: 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 定义为一个酶活力单位。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.3mL; V 样: 加入反应体系中样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g; 500: 细菌或细胞数量, 500 万; T: 反应时间, 10min。

六、注意事项

1、每个测定管需要设置一个对照管,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 5 min 沸水浴处理。

2、不同样本的多酚氧化酶最佳的反应温度略有差别,可在 25-37°C 之间进行调节。