

多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO）试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

PPO 能够催化邻苯二酚产生醌，后者在 525nm 有特征光吸收。

需自备的仪器和用品：

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

试剂组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：5mL×1 瓶，4℃保存；

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、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 525nm，蒸馏水调零。

2、样本测定（在 EP 管中依次加入下列试剂）

试剂名称（ μ L）	测定管	对照管
样本	50	
煮沸的样本		50
试剂一	200	200

试剂二	50	
蒸馏水		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, 25℃ 离心 10min, 收集上清, 取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中, 525nm 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: 煮沸样本的操作: 取 300 μL 离心上清于 EP 管中, 进行 5min 95℃ 水浴处理; 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 525nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

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 525nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(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 525nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

(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 525nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

V 反应: 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 525nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

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

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 525nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(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 525nm 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 525nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位。

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

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。