

## 多酚氧化酶(PPO)活性检测试剂盒说明书

### Polyphenol Oxidase Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK064

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES09	60mlx1	4℃保存, 用前混匀;
AK064-A	40mlx1	4℃保存
AK064-B	10mlx1	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、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样品处理:

1. 细菌、细胞或组织样品的制备: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 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: 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)或果汁样品的处理: 取 0.1mL 血清(浆)或果汁加入 1mL 提取液 ES09, 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 525nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定, 在 EP 管中按照下表操作

试剂名称	测定管 (ul)	对照管(ul)
AK064-A	600	600
AK064-B	150	150
待测样本	150	
煮沸的待测样本		150

37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)中准确水浴 10min 后, 95℃水浴 5min, 充分混匀, 10000g, 25℃离心 10min, 取上清, 525nm 处检测测定管和对照管吸光度。  
 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。

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待测液, 然后集中进行 5min 95℃水浴处理。

PPO 活性计算:

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 525nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

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 525nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位。

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

**注:**  $V_{\text{反总}}$ : 反应体系总体积, 0.9mL;  $V_{\text{液}}$ : 加入血清(浆)或果汁体积, 0.1mL;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.15mL;  $V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;  $T$ : 反应时间, 10 min;  $\text{Cpr}$ : 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。