

多酚氧化酶（PPO）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10104

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4℃ 保存
粉剂	粉剂×1 瓶	4℃ 保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	4℃ 保存
试剂二	液体 5 mL×1 瓶	4℃ 保存

溶液的配制：

- 1、提取液：临用前将粉剂一倒入提取液中，溶液为悬浊液，使用前需摇匀。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；8000g 4℃ 离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。
- 2、称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。
- 3、血清（浆）：直接检测。

二、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 管中依次加入下列试剂）

试剂名称（ 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℃(哺乳动物)或 25℃(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 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: 每个测定管需要设置一个对照管, 可以在不同对照管中加入不同样本的粗酶液, 然后集中进行 5min 沸水浴处理。

三、PPO 活性计算

a. 用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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。

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

(2) 按样本质量计算:

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。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算:

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 0.005 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本质量计算:

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。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算:

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，0.05mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞数量，500 万；T：反应时间，10min。

注意事项：

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℃之间进行调节。

相关发表文献：

[1] Li B, Ding Y, Tang X, et al. Effect of L-Arginine on Maintaining Storage Quality of the White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*)[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(4): 563-574.

[2] B Li, Y Ding, X Tang, et al. MTA1 promotes the invasion and migration of pancreatic cancer cells potentially through the HIF- α /VEGF pathway. Journal of Receptor and Signal Transduction Research. August 2018;(IF2.998)

参考文献：

[1] González, Eva M, De Ancos B, Cano M P. Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(10):4068-4072.

[2] Hong - Wei Zhou, Feng X. Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*)[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1991, 57(3):307-313.

[3] Tang W, Newton R J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.)[J]. plant science, 2004, 167(3):621-628.