

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 样

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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体, 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体, 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体, 10mL×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 (μL)	测定管	对照管
样本	180	
煮沸的样本 ^{【注 1】}		180
试剂一	720	720
试剂二	180	
蒸馏水		180

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 中准确水浴 10min (酶促反应时间) 后, 95℃ 水浴 5min (终止酶促反应) 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。ΔA=A 测定管-A 对照管。

【注 1】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:

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。

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

V 反总：反应体系总体积，1.08mL；V 液：加入血清（浆）或果汁体积，0.1mL；V 样：加入样本体积，0.18mL；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。