多酚氧化酶（PPO）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC0195

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ΔA=A 测定-A 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。

PPO（U/mg prot）= ΔA÷0.01×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T =60×ΔA÷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。

PPO（U/g 质量）=ΔA÷0.01×V 反总÷（W÷V 样总×V 样）÷T =60×ΔA÷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。

PPO（U/10^4 cell）=ΔA÷0.01×V 反总÷（500÷V 样总×V 样）÷T =0.12×ΔA

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。

PPO（U/mg prot）=ΔA÷0.005×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T =120×ΔA÷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。

PPO（U/g 质量）=ΔA÷0.005×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷T =120×ΔA÷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。

PPO（U/10^4 cell）=ΔA÷0.005×V 反总÷（500÷V 样总×V 样）÷T =0.24×ΔA

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.