

## 多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO)

## 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 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/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 (μL)             | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------|-----|-----|
| 样本                    | 50  |     |
| 煮沸的样本 <sup>【注1】</sup> |     | 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（酶促反应时间）后，95℃水浴 5min（终止酶促反应），冷却至室温，10000g，25℃离心 10min，收集上清，取 200 μL 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 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:**

**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。

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

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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.3mL； $V_{\text{液}}$ ：加入血清（浆）或果汁体积，0.1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.05mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，10 min； $C_{\text{pr}}$ ：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。

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

**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。

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