

多酚氧化酶(PP0)活性检测试剂盒

(货号: SH3017 酶标法 96T)

一、产品简介

多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, PP0, EC 1.14.18.1) 广泛存在于植物组织中, 是导致果蔬酶促褐变的关键酶。PP0 催化酚类底物氧化生成邻醌, 邻醌进一步聚合形成褐色色素, 严重影响果蔬的色泽和品质。

二、检测原理

本试剂盒采用邻苯二酚比色法: PP0 催化邻苯二酚 (儿茶酚) 氧化生成邻醌类化合物。邻醌在 420nm 波长处有特征吸收峰, 在特定浓度范围内, 吸光度增加值与 PP0 活性成正比。

三、试剂盒组分与规格

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

四、保存条件: 4℃ 保存, 6 个月有效。

五、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器和蒸馏水。

六、多酚氧化酶(PP0)活性测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定, 了解本批样本情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

①组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分充足样本可取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 在 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5-10 的比例进行提取。

②果实样本 (水分含量高的果实): 称取约 1g 果实组织样本, 加入经预冷的 5mL 纯乙醇, 冰浴匀浆 (保证乙醇在整个匀浆液中体积 80%以上), 低温 (可放冰上或 4℃ 冰箱) 放置 10min; 4℃ 12000g 离心 10min; 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入经预冷的 5mL 纯乙醇混匀, 4℃ 放置 10min; 4℃ 12000g 离心 10min; 弃上清, 留沉淀。最后向沉淀中加入 1mL 经预冷的提取液, 涡旋混匀, 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清液置于冰上待测。

③液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测

①酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 420nm。

②所有试剂解冻至室温 (25℃) 或于水浴锅 (25℃) 中孵育 15-30min。

③在 96 孔板中依次加入:



试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	140
试剂二	10
混匀, 立即于 420nm 处读取各管吸光值 A1, 5 分钟后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

七、结果计算

1、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位 U。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min/g 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T \times D$$

2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位 U。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min/mg prot}) = \Delta A \div (V1 \times Cpr) \div 0.01 \div T \times D$$

3、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟在反应体系中使 420nm 处吸光值变化 0.01 为一个酶活单位 U。

$$PPO(\Delta OD_{420}/\text{min/mL}) = \Delta A \div 0.01 \div V1 \div T \times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.05mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本质量, g;

T---反应时间, 1min;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒 (货号: AR0146)。