

## 多酚氧化酶(PPO)检测试剂盒(邻苯二酚微板法)

### 产品简介:

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是自然界中分布极广的一种金属蛋白酶, 普遍存在于植物、真菌、昆虫的质体中, 甚至在土壤中腐烂的植物残渣上都可以检测到多酚氧化酶的活性, 多酚氧化酶是一种蛋白体, 在茶树生命活动和茶叶加工过程中参与一系列由酶促活动而引起的化学变化, 故又被称为生物催化剂; 该酶属于细胞木质素合成途径中间的关键酶, 研究该酶可以探讨多种生物细胞发育过程中木质素沉积的代谢机理, 为减少水果石细胞含量提高其品质提供依据。

Yuanye 多酚氧化酶(PPO)检测试剂盒(邻苯二酚微板法)检测原理是 PPO 能催化分子态氧将酚类化合物(一元酚或二元酚)氧化为醌类, 常以邻苯二酚作为底物, 其氧化产物是茶褐色化合物邻苯二醌, 在 410~450nm 区间内有特异吸收峰, 可通过分析邻苯醌, 检测 PPO 的酶活性大小。本产品在最适条件下采用每隔一定时间测定产物生成量的方法, 于酶标仪 420nm 处检测吸光度, 以吸光度变化所需酶量进行计算, 主要用于植物组织的裂解液或匀浆液、血清等样品中内源性的多酚氧化酶活性, 尤其适用于检测水果、蔬菜或茶叶中多酚氧化酶活性。该试剂盒仅用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。

### 产品组成:

| 名称 \ 编号                       | R30313<br>120T | Storage |
|-------------------------------|----------------|---------|
| 试剂(A): PPO Lysis Buffer       | 100ml          | 4℃      |
| 试剂(B): PPO Assay Buffer       | 30ml           | 4℃      |
| 试剂(C): PPO Substrate Solution | 8ml            | 4℃ 避光   |
| 使用说明书                         | 1 份            |         |

### 自备材料:

- 1、植物组织、蒸馏水
- 2、研钵或匀浆器、离心管、水浴锅、低温离心机、96 孔板、酶标仪

### 操作步骤(仅供参考):

#### 1、准备样品:

①植物样品: 按植物组织或水果中层果肉质量(g): 预冷的 PPO Lysis Buffer 体积(ml)为 1:5~10 的比例(建议取 0.05g 组织, 加入 0.25~0.5ml Lysis Buffer), 进行冰浴研磨或匀浆, 4℃ 10000rpm 离心 10min, 取上清液置冰上备用, 可-20℃冻存, 用于多酚氧化酶的检测。

③细胞或组织样品: 取恰当的细胞或组织裂解液, 如有必要用 PPO Lysis Buffer 进行适

当匀浆, 4℃ 10000g 离心 15~20min, 取上清液, -20℃冻存, 用于多酚氧化酶的检测。

④高活性样品: 如果样品中含有较高活性的多酚氧化酶, 可以使用 PPO Lysis Buffer 进行恰当的稀释。

- 2、PPO 加样: 提前准备好 96 孔板, 按照下表设置对照孔、测定孔, 注意: 对照管、测定管中样品为同一待测样品, 但对对照孔中为提前加热煮沸 10min 的样品; 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡, 如果样品中的 PPO 活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置 2 平行管, 求平均值。(样品最后加入, 且加入后需立即进行检测和计时。)

| 加入物(μl)                | 对照孔(可选)         | 测定孔 |
|------------------------|-----------------|-----|
| PPO Assay Buffer       | 220             | 220 |
| PPO Substrate Solution | 55              | 55  |
| 待测样品                   | 5.5(提前煮沸 10min) | 5.5 |

- 3、PPO 检测: 酶标仪 420nm 立即测定对照孔、测定孔的吸光度(记为  $A_{\text{对照}0}$ 、 $A_{\text{测定}0}$ )作为初始值; 并每隔 1min 测定一次, 连续测定, 至少获得 6 个点的数据, 可适当延长至 10min。

注意: 该反应系统是利用速率变化求得相应 OD 的变化, 因此加入待测样品后应立即计时非常重要, 每次检测指标不宜过多, 否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。

### 计算:

PPO 活性单位的定义: 在该实验条件下, 每 1min 吸光度变化 0.01 所需酶量为一个活性单位。

$$\text{组织样品 PPO(U)} = \{(A_{\text{测定}x} - A_{\text{测定}0}) \times V_T\} / (W \times V_S \times 0.01 \times t)$$

$$\text{液体样品 PPO(U)} = (A_{\text{测定}x} - A_{\text{测定}0}) / (0.01 \times t)$$

式中:  $A_{\text{测定}x}$  = 反应 6min 时测定管的吸光度

$A_{\text{测定}0}$  = 加入样品后测定的测定管吸光度

$W$  = 组织样本的重量(g)

$V_T$  = 提取酶液的总体积(ml)

$V_S$  = 测定时所用酶液体积(ml)

$t$  = 反应时间(min) = 6

### 注意事项:

- 1、待测样品中不能含有酶抑制剂, 同时需避免反复冻融。
- 2、提取 PPO 酶液时, 注意低温操作, 防止酶活性降低, 4℃保存 2~3 天, 亦可 -20℃保存。
- 3、以煮沸的酶液为对照时, 酶要充分失活。
- 4、当发现样品测不出活性或活性较低时, 可选做对照管, 并非所有样品均需要对照。

- 5、应进行预实验，测定每分钟反应体系的吸光度值的变化，确定该酶促反应速度呈线性变化(初级反应)的时间段。这样，可以只测定某一段时间内反应溶液的初始吸光度值和最终值这两个数据，就可以计算每分钟吸光度值变化的增加量。
- 6、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，每次检测指标不宜过多，否则操作时间不一，有可能导致样本间的差异。
- 7、试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。
- 8、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**有效期：**6个月有效；低温运输，4℃保存。