

多酚氧化酶（PPO）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 55 mL×1 瓶	2-8℃保存
粉剂一	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 22 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存

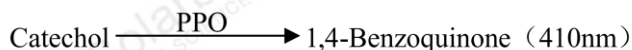
溶液的配制：

- 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。

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/细胞超声破碎仪、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 200W，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。若有浑浊请离心后去上清使用。

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，分光光度计蒸馏水调零。
- 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°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种)中准确水浴 10min 后,迅速放入沸水中加热 10min(缠封口膜,防止爆盖)。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 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

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。

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

(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。

$$\text{PPO 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.01 \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 60 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

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。

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

(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。

$$\text{PPO 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 120 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{PPO 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \times V_{\text{反总}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 0.24 \times \Delta A$$

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°C 之间进行调节。

相关发表文献:

- [1] Zheng XR, Zhang MJ, Qiao YH, Li R, Alkan N, Chen JY, Chen FM. Cyclocarya paliurus Reprograms the Flavonoid Biosynthesis Pathway Against Colletotrichum fructicola. *Front Plant Sci.* 2022 Jun 30;13:933484. doi: 10.3389/fpls.2022.933484. PMID: 35845688; PMCID: PMC9280340.
- [2] Finzi AC, Abramoff RZ, Spiller KS, Brzostek ER, Darby BA, Kramer MA, Phillips RP. Rhizosphere processes are quantitatively important components of terrestrial carbon and nutrient cycles. *Glob Chang Biol.* 2015 May;21(5):2082-94. doi: 10.1111/gcb.12816. Epub 2015 Jan 28. PMID: 25421798.
- [3] Xu W, Yang Q, Yang F, Xie X, Goodwin PH, Deng X, Tian B, Yang L. Evaluation and Genome Analysis of *Bacillus subtilis* YB-04 as a Potential Biocontrol Agent Against Fusarium Wilt and Growth Promotion Agent of Cucumber. *Front Microbiol.* 2022 Jun 9; 13:885430. doi: 10.3389/fmicb.2022.885430. PMID: 35756052; PMCID: PMC9218633.
- [4] Shang XC, Cai X, Zhou Y, Han X, Zhang CS, Ilyas N, Li Y, Zheng Y. *Pseudomonas* Inoculation Stimulates Endophytic Azospira Population and Induces Systemic Resistance to Bacterial Wilt. *Front Plant Sci.* 2021 Sep 22; 12:738611. doi: 10.3389/fpls.2021.738611. PMID: 36406638; PMCID: PMC9673043.
- [5] Dong Q, Liu Q, Goodwin PH, Deng X, Xu W, Xia M, Zhang J, Sun R, Wu C, Wang Q, Wu K, Yang L. Isolation and Genome-Based Characterization of Biocontrol Potential of *Bacillus siamensis* YB-1631 against Wheat Crown Rot Caused by *Fusarium pseudograminearum*. *J Fungi (Basel).* 2023 May 9;9(5):547. doi: 10.3390/jof9050547. PMID: 37233258; PMCID: PMC10219336.

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.

相关系列产品:

- BC0210/BC0215 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性检测试剂盒
- BC0170/BC0175 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒
- BC0200/BC0205 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒
- BC0090/BC0095 过氧化物酶 (POD) 活性检测试剂盒

