多酚氧化酶（PPO）活性检测试剂盒说明书

规格：48 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。

3. 本试剂盒仅用于科研。

4. 各测定管需设自身对照，对照管加入对应粗酶液后，可集中 95°C 水浴 5 min 灭活。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	55 mL×1	4°C	
试剂一	20 mL×1	4°C	
试剂二	2.5 mL×1	4°C避光	

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000 g，4°C离心 10 min，取上清，置冰上待测。

2. 细菌/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/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/细胞加入 1 mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；8000 g，4°C离心 10 min，取上清，置冰上待测。

3. 液体样本：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议取 0.1 mL 液体加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000 g，4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

五、测定步骤

1.酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 525 nm 处。

2.在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	50	-
煮沸的样本	-	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 10 min（酶促反应时间）后，95℃水浴 5 min（终止酶促反应），冷却至室温，10000 g，常温离心 10 min，收集上清，取 200 μL 至 96 孔板中，525 nm 处测定吸光度，记 A 测定、A 对照，计算ΔA=A 测定-A 对照。每个测定管需设置一个对照管。		

六、计算

1. 按照样本质量计算

单位定义：每分钟每 g 组织在每 mL 反应体系中使 525 nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位 U。

多酚氧化酶（U/g 鲜重）=ΔA×V 反总÷（W×V 样÷V 样总）÷0.005÷T=120×ΔA÷W

2. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）

单位定义：每分钟每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中使 525 nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位 U。

多酚氧化酶（U/mg prot）=ΔA×V 反总÷（V 样×Cpr）÷0.005÷T=120×ΔA÷Cpr 按照液体样本体积计算

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 525 nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位 U。

多酚氧化酶（U/mL）=ΔA×V 反总÷（V 液×V 样÷V 样总）÷0.005÷T=120×ΔA÷V 液。

3. 按细菌/细胞数量计算

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 525 nm 处吸光值变化 0.005 为一个酶活力单位 U。

多酚氧化酶（U/10^4 cell）=ΔA×V 反总÷（N×V 样÷V 样总）÷0.005÷T=120×ΔA÷N

V 反总：反应体系总体积，0.3 mL；V 液：加入血清（浆）或果汁体积，0.1 mL；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；N：细胞/细菌总数，（万个）。

七、产品简介

多酚氧化酶（PPO）是植物体内一类含铜的氧化还原酶，广泛存在于植物细胞质体和微体中，催化酚类底物氧化为醌类物质。主要功能是参与植物防御反应、伤口愈合及次生代谢途径，在组织褐变、抗逆响应和木质素合成过程中发挥关键作用，是评价植物抗逆性和采后品质变化的重要酶学指标。