（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K259-S

产品规格：50 assays(25 samples) /100 assays(50 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计（410 nm）

Elabscience®多酚氧化酶（PPO）比色法测试盒

Polyphenol Oxidase (PPO) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测植物组织样本中多酚氧化酶（PPO）的活性。

检测原理

多酚氧化酶（PPO）能将酚类化合物催化氧化为醌类物质，后者在 410 nm 处有特征光吸收，通过与对照管对比吸光度值的增加，即可计算出 PPO 酶的活性。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法（货号 E-BC-K168-M）进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL × 1 瓶	60 mL × 2 瓶	2-8℃ 保存 12 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	40 mL × 1 瓶	40 mL × 2 瓶	2-8℃ 保存 12 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	10 mL × 1 瓶	20 mL × 1 瓶	2-8℃避光 保存 12 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：紫外-可见光分光光度计（410 nm），恒温水浴锅（100℃）

试剂准备

① 试剂一在使用前，先放至37℃恒温箱中温育20 min，待其完全澄清后方可使用。

② 试剂二和试剂三平衡至室温后方可使用。

样本准备

① 样本处理

A 粗酶液的提取（用于测定管）

取 0.1 g 新鲜植物组织，按照重量（g）：体积（mL）=1：9 的比例加入试剂一，进行匀浆，匀浆后，室温，11000 × g 离心 15 min，取上清液待测。

B 粗酶液的处理（用于对照管）。

粗酶液提取完后，取上清液的 50%到 1.5 mL EP 管，100℃煮沸 5 min，取出流水冷却至室温，作为对照管煮沸的上清用。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择预期差异较大的2-3个样本，稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验结果，请参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%辣椒匀浆	不稀释	10%玉米匀浆	不稀释
10%土豆匀浆	不稀释	10%生姜匀浆	不稀释
10%苹果匀浆	不稀释	10%梨匀浆	不稀释
10%山药匀浆	不稀释		

实验关键点

① 加样时需准确操作，37℃恒温箱中孵育时间严格控制，孵育后应立即转入 100℃沸水浴中。

② 每个待测样本都需要设定一个测定管和对照管，沸水浴时，最好提前在盖上扎一个小孔防止管盖弹开。

③ 反应结束，如发现个别样本管内在沸水浴后出现悬浮物，属于正常现象，室温，11000 × g 离心 10 min 后再取上清测定其 OD 值即可。

操作步骤

① 对照管：向 1.5 mL 的 EP 管中加入 600 μL 的试剂二，
测定管：向 1.5 mL 的 EP 管中加入 600 μL 的试剂二；

② 向步骤①各管中加入 150 μL 试剂三；

③ 向步骤②测定管中加入 150 μL 的粗酶液上清；
向步骤②的对照管中加入 150 μL 煮沸处理的粗酶液上清；

④ 涡旋混匀后，于 37℃恒温箱中准确孵育 3 min，取出后立即 100℃水浴 5 min，然后流水冷却至室温；

⑤ 1 mL 石英比色皿，双蒸水调零，紫外-可见分光光度计于 410 nm 处测定 OD 值（测定管 OD 值记为 A_1，对照管 OD 值记为 A_2，$\triangle A = A_1 - A_2$）。

操作表

	测定管	对照管
试剂二(μL)	600	600
试剂三(μL)	150	150
粗酶液上清(μL)）	150	--
煮沸处理的粗酶液上清(μL)	--	150
涡旋混匀后，于 37℃恒温箱中准确孵育 3 min，取出后立即 100℃水浴 5 min，然后流水冷却至室温；1 mL 石英比色皿，双蒸水调零，紫外-可见光分光光度计于 410 nm 处测定 OD 值（测定管 OD 值记为 A_1，对照管 OD 值记为 A_2，$\triangle A = A_1 - A_2$）。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用考马斯亮蓝法(货号 E-BC-K168-M)进行测定。

结果计算

多酚氧化酶(PPO)活性单位定义：37℃条件下，每分钟每毫克组织蛋白在反应体系中使波长 410 nm 处吸光值变化 0.01 的酶量为一个活性单位。

$$\text{PPO 酶活(U/mgprot)} = \triangle A \div 0.01 \div V_1 \div C_{pr} \div T \times f$$

$$= 222.2 \times \triangle A \div C_{pr} \times f$$

注解:

△A：测定管 OD 值与对照管 OD 值的差（$\triangle A = A_1 - A_2$）

V_1：取样量，0.15 mL

T：反应时间，3 min

C_{pr}：样本加入检测体系前的蛋白浓度（mgprot/mL）

f：样本加入检测体系前稀释的倍数

附录1 关键数据

技术参数

平均批间差	9.8%	**平均批内差**	4.6 %

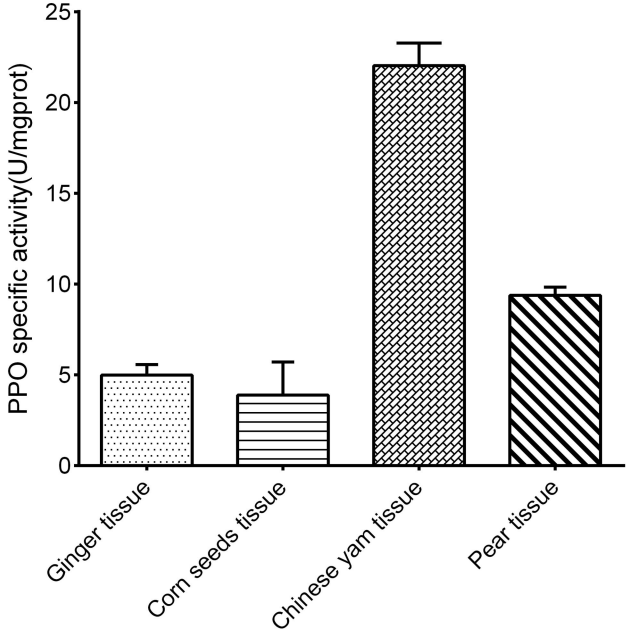
附录2 实例分析

例如检测山药块茎组织(数据仅供参考):

取0.1 g山药块茎样本，加0.9 mL试剂一提取，匀浆离心后，取0.15 mL山药果肉匀浆上清液，按操作表检测，结果如下：对照管OD值A_2为0.129，测定管OD值A_1为0.324，$\triangle A = A_1 - A_2 = 0.324 - 0.129 = 0.195$，测定其蛋白浓度为1.97 mgprot/mL，代入公式，计算结果如下：

$$\text{PPO 酶活(U/mgprot)} = 222.2 \times 0.195 \div 1.97 = 21.99 \text{ U/mgprot}$$

按照说明书操作，测定生姜组织（10%组织匀浆的蛋白浓度2.43 mgprot/mL，加样量0.15 mL）、玉米种子组织（10%组织匀浆的蛋白浓度2.57 mgprot/mL，加样量0.15 mL）、山药块茎组织（10%组织匀浆的蛋白浓度1.97 mgprot/mL，加样量0.15 mL）、梨果肉组织（10%组织匀浆的蛋白浓度为3.114 mgprot/mL，加样量0.15 mL）中PPO的酶活（如下图）：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测定过程中读数不稳定	水浴煮沸温度过低或时间过短	保证沸水浴煮沸 5 min
样本测不出值	样本自身酶活含量较低	可将样本取样量提升一倍
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。