

## 山梨醇氧化酶（SOX）测定试剂盒说明书

（分光法 24 样）

### 一、产品简介：

山梨醇作为一种运输糖，被卸载到果实中时转化成其他糖类物质，山梨醇氧化酶（sorbitol oxidase, SOX）就是山梨醇转化和利用过程中的关键酶之一，该酶与果实的品质以及果实中糖类物质的积累密切相关。

山梨醇氧化酶（SOX）催化山梨醇生成葡萄糖，葡萄糖进一步与 3,5-二硝基水杨酸反应，生成棕红色氨基化合物，经光谱扫描在 540nm 有特征光吸收，在一定范围内 540nm 光吸收增加速率与山梨醇氧化酶（SOX）活性成正比。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 7mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	用前加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用；用不完的试剂 4℃ 保存；
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、山梨醇氧化酶（SOX）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

称样本 0.1g（水分充足的样本可取 0.5g）于研钵中，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆后转入离心管中。12000rpm，4℃ 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、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管中依次加入：

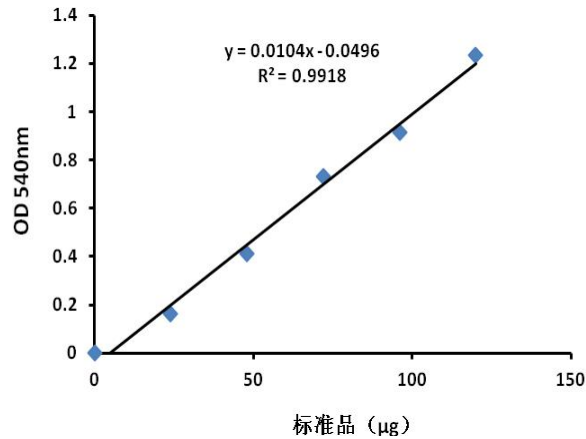
试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	120	160
试剂二	40	
混匀，30℃（水浴锅或恒温培养箱）下孵育 30min		
试剂三	200	200
混匀，沸水浴（95-100℃）（可用封口膜缠紧 EP 管）5min，流水冷却		
蒸馏水	400	400
混匀，全部澄清液体转入 1mL 玻璃比色皿中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本自身需做一个自身对照）。		

【注】: 1.若吸光值大于 2, 可减少样本加样量 V1 (如减至 20 $\mu$ L, 则试剂一相应增加), 则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 $\Delta A$  值在零附近徘徊, 可延长 30 $^{\circ}$ C 水浴时间 (如增至 60min), 则改变后的反应时间 T 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线方程为  $y = 0.0104x - 0.0496$ ; x 为标准品质量 ( $\mu$ g), y 为 $\Delta A$ 。



2、按蛋白浓度计算:

单位定义: 37 $^{\circ}$ C 每毫克蛋白每分钟产生 1 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{山梨醇氧化酶 (SOX) } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0496) \div 0.0104] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 80.1 \times (\Delta A + 0.0496) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按鲜重计算:

单位的定义: 37 $^{\circ}$ C 每克组织每分钟产生 1 $\mu$ g 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{山梨醇氧化酶 (SOX) } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0496) \div 0.0104] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 80.1 \times (\Delta A + 0.0496) \div W \end{aligned}$$

V----加入提取液体积, 1mL; V1----加入反应体系中样本体积, 0.04mL;

T----反应时间, 30min; W----样本鲜重, g;

Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (3mg/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照测定管的加样顺序依次加样操作, 根据结果即可制作标准曲线。