

山梨醇氧化酶（SOX）测定试剂盒说明书

（微板法 48 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 60mL×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 2.5mL 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：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

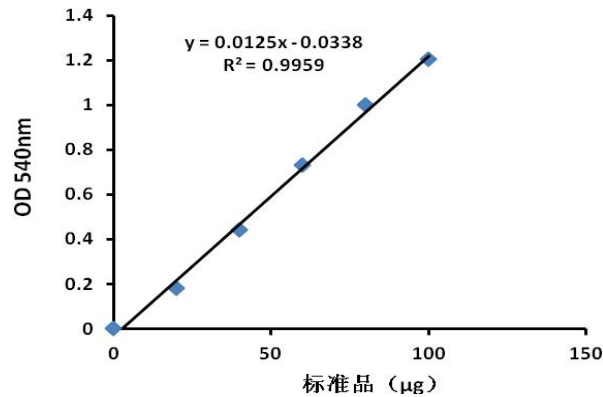
试剂名称（ μL ）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	60	80
试剂二	20	
混匀，30℃（水浴锅或恒温培养箱）下孵育 30min		
试剂三	100	100
混匀，沸水浴（95-100℃）（可用封口膜缠紧 EP 管）5min，流水冷却		
蒸馏水	200	200
混匀，取出 200 μL 至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本自身需做一个自身对照）。		

【注】：1.若吸光值大于 1.8，可减少样本加样量 V1（如减至 10 μL ，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 ΔA 值在零附近徘徊，可延长 30°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 $y = 0.0125x - 0.0338$ ；x 为标准品质量（ μg ），y 为 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算：

单位定义：37°C每毫克蛋白每分钟产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{山梨醇氧化酶 (SOX) } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0338) \div 0.0125] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 133.3 \times (\Delta A + 0.0338) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按鲜重计算：

单位的定义：37°C每克组织每分钟产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{山梨醇氧化酶 (SOX) } (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0338) \div 0.0125] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 133.3 \times (\Delta A + 0.0338) \div W \end{aligned}$$

V----加入提取液体积，1mL； V1----加入反应体系中样本体积，0.02mL；

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（5mg/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°C保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 1, 2, 3, 4, 5. 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。