山梨醇氧化酶（SOX）测定试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TDX056　微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 瓶	4℃保存	1. 用前加入 2.5mL 蒸馏水充分溶解备用； 2. 用不完的试剂 4℃保存。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、山梨醇氧化酶（SOX）活性测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（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		

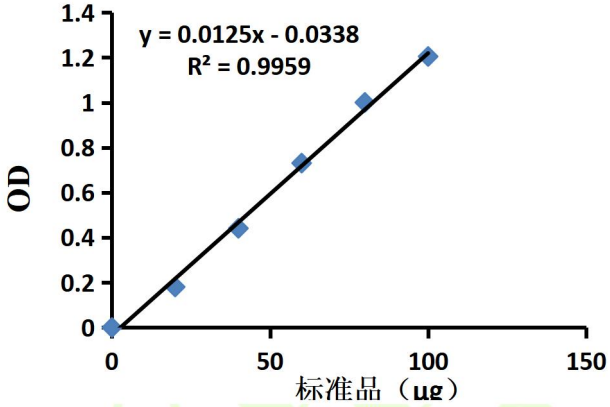
蒸馏水	200	200
混匀，取出 200μL 至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个样本自身需做一个自身对照）。		

【注】：1.若吸光值大于 1.8，可减少样本加样量 V1（如减至 10μL，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℃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℃每毫克蛋白每分钟产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

山梨醇氧化酶（SOX）（μg/min/mg prot）=[(ΔA+0.0338) ÷0.0125]÷(V1×Cpr) ÷T

=133.3×(ΔA+0.0338) ÷Cpr

3、按鲜重计算：

单位的定义：37℃每克组织每分钟产生 1μg 葡萄糖定义为一个酶活性单位。

山梨醇氧化酶（SOX）（μg/min/g 鲜重）=[(ΔA+0.0338) ÷0.0125]÷(W×V1÷V) ÷T

=133.3×(ΔA+0.0338)÷W

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℃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。