

## 山梨醇氧化酶（SOX）测定试剂盒说明书

（货号：ADS-F-TDX056 分光法 24 样 有效期：3 个月）

### 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 1 支	4℃保存	1. 用前加入 1.5mL 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、所需的仪器和用品：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

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（μL）	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		

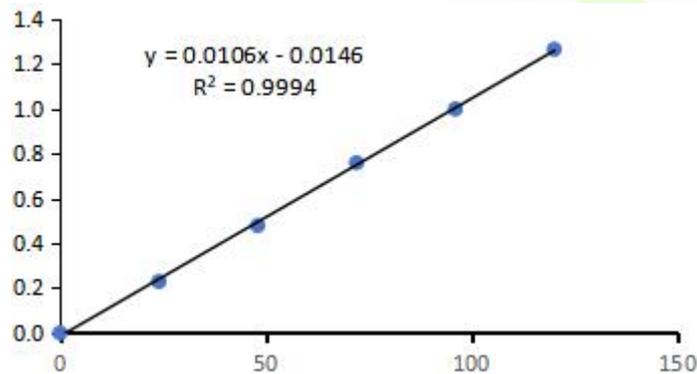
蒸馏水	400	400
混匀，全部澄清液体转入 1mL 玻璃比色皿中，于 540nm 处读取吸光值 A, $\Delta A=A$ 测定-A 对照(每个样本自身需做一个自身对照)。		

【注】：1.若吸光值大于 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  $y = 0.0106x - 0.0146$ ；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。

$$\text{山梨醇氧化酶 (SOX)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 0.0106] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 78.6 \times (\Delta A + 0.0146) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{山梨醇氧化酶 (SOX)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0146) \div 0.0106] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 78.6 \times (\Delta A + 0.0146) \div W$$

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 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），标准品母液浓度为 3mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0

各标准管混匀待用。

- 3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		40
试剂一	120	120
试剂二	40	40
混匀，30°C (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°C) (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， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		