

## 山梨醇氧化酶（SOX）测定试剂盒说明书

（货号：BP10319W 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；<br>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；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>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、指标测定：

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 |     |     |

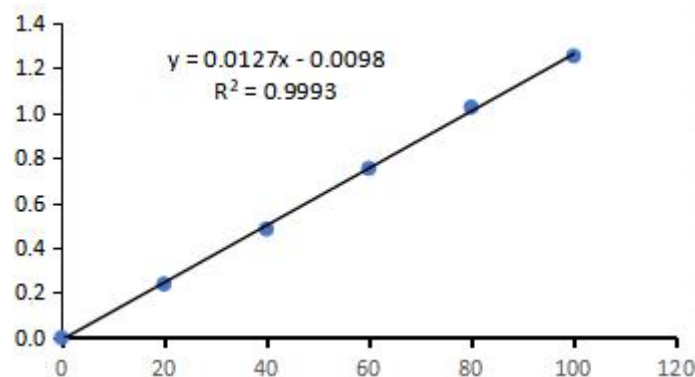
|                                                                         |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 蒸馏水                                                                     | 200 | 200 |
| 混匀，取出 200μL 至 96 孔板中，于 540nm 处读取吸光值 A，<br>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  $y = 0.0127x - 0.0098$ ；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。

$$\text{山梨醇氧化酶 (SOX)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0098) \div 0.0127] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ = 131.2 \times (\Delta A + 0.0098) \div Cpr$$

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。

$$\text{山梨醇氧化酶 (SOX)} (\mu\text{g}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0098) \div 0.0127] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 131.2 \times (\Delta A + 0.0098) \div W$$

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 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)，标准品母液浓度为 5mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 1, 2, 3, 4, 5. 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<br>mg/mL | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品稀释液<br>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                                                              | 20  |              |
| 蒸馏水                                                             |     | 20           |
| 试剂一                                                             | 60  | 60           |
| 试剂二                                                             | 20  | 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， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。 |     |              |