

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

离子结合型果胶 (ISP) 含量试剂盒说明书

分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

测定意义：

果胶是构成细胞初生壁和中胶层的主要成分，主要由原果胶、果胶酸甲酯和果胶酸组成。果胶中含有半乳糖醛酸、乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸等，是许多高等植物细胞壁中含量最丰富的多糖成分，其独特的物理、化学性质影响着植物源食品的口感和品质。果胶间以 Ca^{2+} 桥及其他离子键、氢键、糖苷键、酯键和苯环偶联的方式交联，通过不同的抽提方法可以提取各种形式的果胶，如水溶性果胶 (WSP)、离子结合型果胶 (ISP) 和共价结合果胶 (CSP)。

测定原理：

利用带有螯合剂的酸溶液提取离子结合型果胶 (ISP)，采用吡啶比色法测定果胶含量。果胶水解成半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与吡啶试剂进行缩合反应，生成物质在 530 nm 处有最大吸收峰。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、80%乙醇、丙酮、浓硫酸（不允许快递）、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液一	液体 100mL × 1 瓶	4℃保存	提取液：80%乙醇，自备。即将80ml无水乙醇和20ml蒸馏水混合。
提取液二	液体 30mL × 1 瓶	4℃保存	
提取液三	液体 50mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 60mL × 1 瓶	4℃保存	自备（浓硫酸）
试剂二	液体 3mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 5mL × 1 瓶	4℃保存	
标准品	粉剂 × 1 瓶	4℃保存	10mg半乳糖醛酸，临用前加入0.943ml提取液三，配成50 μmol/mL的标液。

技术指示：

最低检出限：0.0212 μmol/mL。

线性范围：0.025-2.5 μmol/mL。

样品的前处理:

取约 0.1g 样本, 加入 1mL 提取液一, 室温快速匀浆, 95°C水浴 20min, 冷却至室温, 4000g 25°C离心 10min, 弃上清。沉淀加入 1.5mL提取液一和丙酮交替各洗两遍(涡旋振荡 2min 左右, 4000g 25°C离心 10min, 弃上清即可), 沉淀即为粗细胞壁, 加入 1mL 提取液二(去除淀粉)浸泡 15 小时, 4000g 25°C离心 10min, 弃上清, 加入 1mL 提取液三, 充分匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清液待测。

1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 530nm 处, 蒸馏水调零。

2、将50 μmol/mL标准液用提取液三稀释为2、1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 μmol/mL的标准溶液备用。

3、操作表:

试剂名称	空白管	标准管	对照管	测定管
样本 (μL)	-	-	100	100
标准品 (μL)	-	100	-	-
蒸馏水 (μL)	100	-	-	-
试剂一 (μL)	800	800	800	800

混匀, 90°C放置10min, 取出后冷却

试剂二 (μL)	-	-	100	-
试剂三 (μL)	100	100	-	100

混匀, 25°C静置 30min 后测定 530nm 处吸光值, 分别记为 A 空白管、A 标准管、A 对照管和 A 测定管。 ΔA 标准=A 标准管-A 空白管, ΔA 测定=A 测定管-A 对照管。

离子结合型果胶含量的计算:

1、标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的 ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 测定带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)

2、离子结合型果胶含量的计算:

离子结合型果胶含量($\mu\text{mol/g}$ 鲜重) = $x \times V$ 提取液三 $\div W = x \div W$

V 提取液三: 加入提取液三的体积, 1mL; W: 样本鲜重, g。

注意事项

- 1、浓硫酸具有强腐蚀性, 操作时需特别注意, 90°C加热取出后冷却再打开盖子, 以防液体飞溅烧伤。建议每次实验冷却时间保持一致。
- 2、若吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。