

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0927

Size: 50T/24S

共价结合型果胶 (CSP) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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）。

二、测定原理：

利用带有螯合剂的酸性液提取共价结合型果胶（CSP），其在酸性条件下水解生成半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与咔唑试剂进行缩合反应，生成物质在 530 nm 处有最大吸收峰。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、丙酮、浓硫酸、无水乙醇和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

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		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	浓硫酸 60mL × 1 瓶	4℃保存	自备

试剂二	液体 3mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 5mL × 1 支	4℃保存	
标准品	粉剂 × 1 支	4℃保存	10mg 半乳糖醛酸，临用前加入 0.943mL 提取液三，配成 50μmol/mL 的标准液，4℃保存。

五、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℃水浴 20min，冷却至室温，4000g，25℃离心 10min，弃上清。沉淀加入 1.5mL 提取液一和丙酮交替各洗 2 遍（涡旋振荡 2min 左右，4000g，25℃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℃离心 10min，弃上清，加入 1mL 提取液三，充分匀浆。8000g，4℃离心 10min，取上清液待测。

六、测定步骤：

- 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 530nm 处，蒸馏水调零。
- 将 50μmol/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。
- 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℃放置 10min，取出后冷却				
试剂二 (μL)	—	—	100	—
试剂三 (μL)	100	100	—	100

混匀，25℃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。

七、共价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、 共价结合型果胶含量的计算：

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

V 提取液三：加入提取液三的体积，1mL；W：样本鲜重，g。

技术指标：

最低检出限：0.0212 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围：0.025-2.5 $\mu\text{mol/mL}$

八、注意事项

1、 浓硫酸具有强腐蚀性，操作时需特别注意，90℃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。