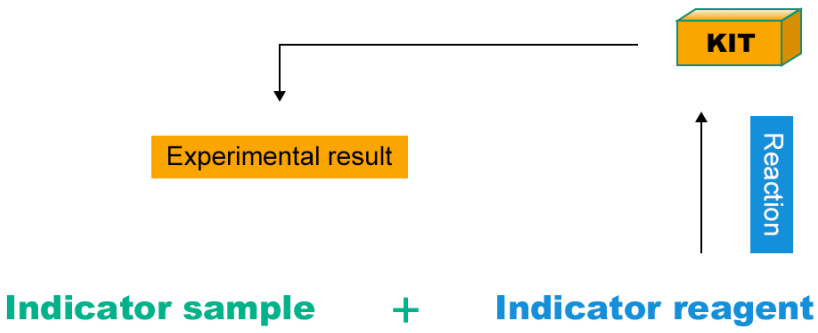
上海茁彩生物科技有限公司

ZCIBIO Technology Co.,Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO：ZC-S0942 Size：100T/48S

可溶性果胶（WSP）检测试剂盒说明书

微量法

***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(Pectin)是构成细胞初生壁和中胶层的主要成分，对细胞起着软化和黏合作用。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：

可溶性果胶在酸性条件下水解生成半乳糖醛酸，后者在硫酸溶液中与咔唑进行缩合反应形成紫红色的化合物，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/酶标仪、台式低温离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96 孔板、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	80%乙醇 200mL		即将 160mL 无水乙醇和 40mL 蒸馏水混合，自备
提取液二	液体 50mL× 1 瓶	4℃保存	
提取液三	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	浓硫酸 25mL×1 瓶		自备
试剂二	液体 2.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 5mL× 支	4℃保存	
标准品	粉剂×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、操作步骤：

- 可溶性果胶的提取：

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 2mL 提取液三，充分匀浆。8000g，4℃离心 10min， 取上清液待测。

六、测定步骤：

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、将 50μmol/mL 标准液用提取液三稀释为 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 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）	-	-	25	25
标准品（μL）	-	25	-	-
蒸馏水（μL）	25	-	-	-
试剂一（μL）	200	200	200	200
混匀、90℃放置 10min，取出后冷却				
试剂二（μL）	-	-	25	-
试剂三（μL）	25	25	-	25
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。△A 标准=A 标准管-A 空白管，△A 测定=A 测定管-A 对照管。				

七、可溶性果胶含量的计算：

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△A 标准为 y 轴,绘制标准曲线,得到标准方程 y=kx+b,将△A 测定带入方程得到 x（μmol/mL）

2、 可溶性果胶含量的计算：

可溶性果胶含量(μmol /g 鲜重)= x×V 提取液三÷W =2x÷W

V 提取液三：加入提取液三的体积，2mL；W：样本鲜重，g。

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。

2、 若吸光值超过 1，可将样本提取液三进行适当稀释再进行测定，并在计算公式中乘以稀释倍数。