

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）含量检测试剂盒说明书

微量法

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。

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	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 50mL × 1 瓶	4℃保存	
提取液三	液体 70mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	浓硫酸 30mL	自备	
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 支	4℃保存	半乳糖醛酸，临用前加入 0.943mL 提取液三，配成 50 μmol/mL 的标准液。

产品说明：

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（GSP）。

利用带有螯合剂的酸性提取液提取离子结合型果胶（ISP），其在酸性条件下水解生成半乳糖醛酸，后者在硫酸溶液中与吡啶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。

试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、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。

操作步骤：

一、离子结合型果胶的提取：

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 1mL 提取液三，充分匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清液待测。

二、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 50 μmol/mL 标准液用提取液三稀释为 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)	-	-	25	25
标准品 (μL)	-	25	-	-
蒸馏水 (μL)	25	-	-	-
试剂一 (μL)	200	200	200	200
混匀、90°C放置 10min，取出后冷却				
试剂二 (μL)	-	-	25	-
试剂三 (μL)	25	25	-	25
混匀，25°C静置 30min 后吸取 200 μL 于微量玻璃比色皿或 96 孔板中测定 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。 $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白管}$ ， $\Delta A_{测定} = A_{测定管} - A_{对照管}$ 。				

三、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 $\Delta A_{标准}$ 为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{测定}$ 带入方程得到 x (μmol/mL)

2、离子结合型果胶含量的计算：

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

V 提取液三：加入提取液三的体积，1mL；W：样本鲜重，g。

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。
- 2、若 ΔA 超过 0.4，可将样本用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