

共价结合型果胶(CSP)含量试剂盒说明书

(货号: G0706W 微板法 96 样)

一、产品简介:

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等形式广泛分布于植物果实、根茎和叶中。果胶间以 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、氢键、糖苷键、酯键等方式与其他物质交联,通过特异的提取方式可以提取得到离子结合型果胶 (ISP) 和共价结合果胶 (CSP)。

本试剂盒用螯合剂的碱溶液特异提取共价结合型果胶 (CSP), 采用硫酸-吡啶比色法测定果胶含量。果胶水解为半乳糖醛酸, 在硫酸溶液中与吡啶进行缩合反应, 生成紫红色物质, 经光谱扫描该物质在 530nm 处有最大吸收峰, 颜色深浅与果胶含量成正比, 进而得共价结合型果胶含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	
提取液 B	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 1.5mL×1 支	4°C 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、乙醇、浓硫酸、研钵。

四、共价结合型果胶(CSP)含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 取 0.1g 组织 (烘干且过筛后的粉末组织可取 0.02g), 加 1.5mL 的 80%乙醇, 研磨匀浆, 85°C水浴 10min, 取出流水冷却后, 8000rpm, 25°C10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。
- ② 向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇震荡混匀 2min, 85°C水浴 10min, 取出流水冷却后, 8000rpm, 25°C10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。
- ③ 加入 1mL 的提取液 A, 90°C水浴 15min (S 间隔 3min 晃动一次), 8000rpm, 室温 (25°C) 离心 10min, 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入 1mL 丙酮震荡混匀, 8000rpm, 室温 (25°C) 离心 10min, 弃上清, 留沉淀, (注:若色素仍很多, 继续用丙酮提取 1-2 次), 打开 EP 管置于 90°C孵育 20min, 使沉淀干燥。
- ④ 向沉淀中加入 1mL 提取液 B, 室温 (25°C) 震荡提取 1 小时后, 8000rpm, 25°C离心 10min, 上清液待测。

2、上机检测:

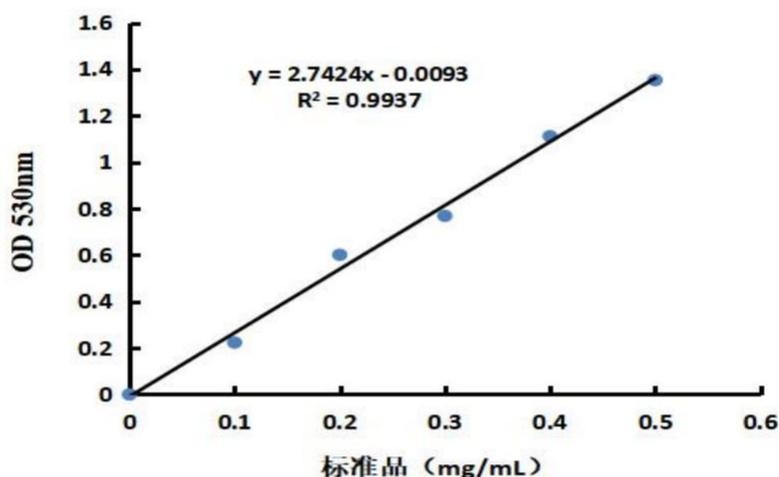
- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长为 530nm;
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释 (如 4 倍, 即 1 份上清液+3 份蒸馏水), 确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	70	
蒸馏水		70
浓硫酸	420	420
可用封口膜缠紧, 85°C水浴 15min 后, 流水冷却至室温。		
试剂一	14	14
混匀, 室温 (25°C) 暗处反应 30min (间隔 10min 混匀 一次), 立即取出 200μL 于 96 孔中, 于 530nm 处读取 吸光值 A, ΔA=A 测定-A 空白。		

- 【注】: 1、浓硫酸必须是分析纯级别, 且不能长期开口放置, 否则影响显色结果。另外浓硫酸具有强腐蚀性, 操作时需特别注意, 85°C加热取出后冷却再打开盖子, 以防液体飞溅烧伤。
2、显色反应必须在暗处反应, 否则颜色很快消失或者变淡, 影响吸光值。
3、若 A 测定管值大于 1.8, 可用蒸馏水稀释样本即待检测上清液, 则稀释倍数 D 需代入公式计算; 或若 A 值再零附近可增加样本取样质量 W。

五、结果计算:

- 1、标准曲线方程: $y = 2.7424x - 0.0093$, x 为标准品浓度 (mg/mL), y 是 ΔA。



- 2、共价结合型果胶(mg/g 重量)=[(ΔA+0.0093)÷2.7424×V1]÷(W×V1÷V)×D
=0.365×(ΔA+0.0093)÷W×D

W---样本重量, g;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.07mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (5mg/mL): 临用前向标准品中加入 2mL 蒸馏水 (现配现用)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。也可根据实际本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。