

离子结合型果胶（ISP）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10646

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 200 mL×1 瓶（自备）	4℃保存
提取液二	液体 50 mL×1 瓶	4℃保存
提取液三	液体 70 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶（自备）	4℃保存
试剂二	液体 3 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	4℃保存
标准品	粉剂×1 支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液一：80%乙醇，自备。即将 80 mL 无水乙醇和 20 mL 蒸馏水混合。提供一个 125mL 空瓶。
- 2、试剂一：浓硫酸 30 mL，自备。
- 3、标准品：10 mg 半乳糖醛酸。临用前加入 0.943 mL 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Ca²⁺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）。

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哌啶进行缩合反应形成紫红色的化合物，生成物质在530nm处有最大吸收峰。

技术指标：

最低检出限：0.0946 μmol/mL

线性范围：0.1-2 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。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。

需自备的仪器和用品：

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、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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 2 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。

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50μmol/mL 标准液用提取液三稀释为2、1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1μmol/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 200μL 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。ΔA 标准=A 标准管-A 空白管，ΔA 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（μmol/mL）。

2、离子结合型果胶含量的计算：

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

V提取液三：加入提取液三的面积，1mL；W：样本质量，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、如果测定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。

实验实例：

- 1、取 0.1g 迎春叶片加入 1mL 提取液一，进行样本处理，取上清液按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 对照管=0.13-0.079=0.051，带入标准曲线 $y=0.3693x-0.0189$ 得出 $x=0.189$ ，带入公式计算离子结合型果胶含量(μmol/g 质量)= $x \div W=1.89 \mu\text{mol/g 质量}$ 。

相关系列产品：

- BC1400/BC1405 总果胶含量检测试剂盒
- BC2630/BC2635 果胶酶活性检测试剂盒
- BC2660/BC2665 多聚半乳糖醛酸酶（PG）活性检测试剂盒