

果胶甲酯化程度 (PMD)检测试剂盒说明书

(微板法 48 样)

一、产品简介：

果胶甲酯化程度(PMD)决定了负电荷数量，这与植物根系细胞壁吸附重金属，抵御重金属毒害密切相关。细胞壁果胶含量和甲酯化程度影响着植物细胞壁对重金属毒害的抵御能力。

果胶甲酯键经皂化处理释放出甲醇，甲醇在醇氧化酶作用下生成甲醛，接着与 2,4-戊二酮反应显色，该有色物质在 412nm 下有特定吸收峰；同时半乳糖醛酸在硫酸溶液中与咪唑进行缩合反应生成紫红色物质，该有色物质在 530nm 处有特征吸收峰。以甲醇生成量与半乳糖醛酸含量的比值计算得到果胶甲酯化程度（PMD）。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体μL×1 支	-20℃保存	用前轻甩几下使液体落入底部，再加 0.56mL 试剂三混匀溶解，分装-20℃冻存，禁止反复冻融。
试剂五	试剂 A 液体μL×1 支 试剂 B(空瓶)×2 瓶	4℃保存	临用前吸取 7mL 的试剂六至一瓶试剂 B 中，再吸取 15μL 的试剂 A 至试剂 B 中，混匀溶解做为试剂五备用。
试剂六	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂七	液体 1.5mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃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、果胶甲酯化程度(PMD)检测：

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 组织样本，加 1mL 的 80%乙醇，研磨匀浆，转移至 EP 管中，静置 10 分钟后于 4℃ 下 8000rpm 离心 10min，弃上清留沉淀。
- ② 向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇，混匀，静置 10 分钟后于 4℃ 下 8000rpm 离心 10 min，弃上清留沉淀。
- ③ 再向沉淀中加入 1 mL 提取液，混匀，沸水浴 1 小时，流水冷却至室温，8000rpm，4℃ 离心 10min，弃沉淀，取上清液即样本待测。

2、检测步骤：

2.1：待检液制备：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	200
试剂一	250
混匀，室温孵育 30min，再加试剂二（约 9μL）调	

PH 至 7-8 之间（用 PH 试纸检测即可），最后再用蒸馏水定容到 0.5mL。即得待检液。

2.2. 甲醇生成量测定：

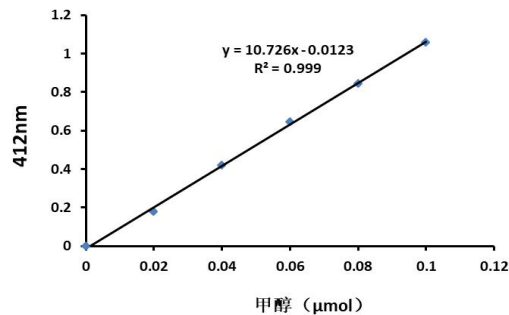
- ① 打开酶标仪，调节波长至 412nm；
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（仅做一次）
待检液	100	
蒸馏水		100
试剂三	90	90
试剂四	10	10
混匀，于 30°C 条件下，孵育 20min		
试剂五	200	200
混匀，60°C 条件下，孵育 15min。（若有明显的浑浊现象可于 8000rpm 室温离心 5min），取出 200 μL 上清液至 96 孔板中，于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：若 ΔA 小于 0.01，可增加待检液加入量 V3（如由 100 μL 增至 150 μL ，则试剂三相应减少），或者增加样本取样质量 W，则改变后的 V3 和 W 需代入公式重新计算。

③ 结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 10.726x - 0.0123$ ，x 为标准品浓度（ μmol ），y 是 ΔA 。



- 2、甲醇生成量($\mu\text{mol/g}$)= $[(\Delta A + 0.0123) \div 10.726 \div V3 \times V2 \div V1 \times V] \div W \times D$
 $= 2.33 \times (\Delta A + 0.0123) \div W \times D$

W---样本重量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---样本体积，0.2mL；

V2---待检液总体积，0.5mL；

V3---加入待检液体积，0.1mL；

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（0.5mmol/mL）：取 0.105mL 分析级甲醇（自备， $M_r=32.04$ ）至 4.9mL 蒸馏水中，混匀即得 0.5mmol/mL 甲醇标准品母液。（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：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 2.2 步骤中的测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

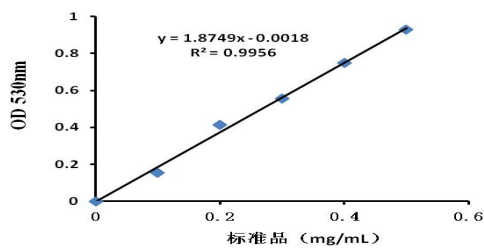
2.3.半乳糖醛酸含量测定:

- ① 打开酶标仪, 调节波长至 530nm;
- ② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
待检液	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。		
试剂七	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, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- ③ 结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 1.8749x - 0.0018$, x 为标准品浓度 (mg/mL), y 是 ΔA 。



2、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/g}$ 重量) = $[(\Delta A + 0.0018) \div 1.8749 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div W \times D$
 $= 6.9 \times (\Delta A + 0.0018) \div W \times D$

W---样本重量, g;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---样本体积, 0.2mL;

V2---待检液总体积, 0.5mL;

Mr---半乳糖醛酸分子量, 194.5;

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。
也可根据实际样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。

3. 果胶甲酯化程度(PMD)结果计算:

果胶甲酯化程度(PMD) (%) = 甲醇生成量 \div 半乳糖醛酸含量 $\times 100\%$