

离子结合型果胶(ISP)含量试剂盒说明书

(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)。

本试剂盒用带有螯合剂的酸溶液特异提取离子结合型果胶 (ISP)，采用硫酸-咪唑比色法测定果胶含量。果胶水解为半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与咪唑进行缩合反应，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，进而得离子结合型果胶含量。

二、测试盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A	液体 120 mL×1 瓶	4℃ 保存	
提取液 B	液体 120 mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	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、离子结合型果胶(ISP)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℃水浴 10min，取出流水冷却后，8000rpm，25℃ 10min，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℃水浴 10min，取出流水冷却后，8000rpm，25℃ 10min，弃上清，留沉淀 (尽量保留沉淀)。
- ③ 加入 1mL 的提取液 A，90℃水浴 15min (间隔 3min 晃动一次)，8000rpm，室温 (25℃) 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℃) 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℃孵育 20min，使沉淀干燥。
- ④ 向沉淀中加入 1mL 提取液 B，室温 (25℃) 震荡提取 1 小时后，8000rpm，25℃ 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 525nm。
- 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℃水浴 15min 后， 流水冷却至室温。		
试剂一	14	14
混匀，室温 (25℃) 暗处反应 30min (间隔 10min 混匀一次)，立即取出 200 μL 于 96 孔中，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

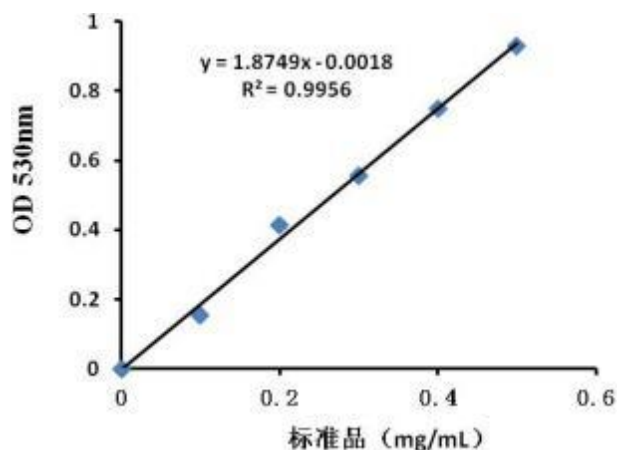
【注】：1、浓硫酸必须是分析纯级别，且不能长期开口放置，否则影响显色结果。另外浓硫酸具有强腐蚀性，操作时需特别注意，85℃加热取出后冷却再打开盖子，以防液体飞溅烧伤。

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： $y = 1.8749x - 0.0018$ ，x 为标准品浓度 (mg/mL)，y 是 ΔA 。



2、离子结合型果胶(mg/g 重量) = $[(\Delta A + 0.0018) \div 1.8749 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D$
 $= 0.53 \times (\Delta A + 0.0018) \div W \times D$

W---样本重量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.07mL；

D---稀释倍数。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (0.5mg/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。