

果胶甲酯化程度试剂盒说明书

微量法 100T/96S

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。

测定意义：

植物细胞壁中的果胶是植物初生细胞壁的主要成分，除了起结构支撑、物质运输等作用外，还具有抵抗逆境的作用。果胶甲酯化程度影响了细胞壁的坚韧程度及其抗性。

测定原理：

果胶甲酯键经皂化处理后释放出甲醇，甲醇与 2,4-戊二酮反应显色，在 412nm 下测定吸光值；同时半乳糖醛酸在 70℃ 下与浓硫酸反应生成 5-甲酰基-2-呋喃甲酸，5-甲酰基-2-呋喃甲酸与 3,5-二甲基苯酚反应产生有色物质，在 450nm 下有最大吸光值。以甲醇生成量与半乳糖醛酸含量的比值代表果胶甲酯化程度。

自备实验用品及仪器：

天平、低温离心机、酶标仪、96 孔板、恒温水浴锅、蒸馏水、硫酸。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：液体 3mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 3mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 3mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂四：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 避光保存；临用前加入 22mL 试剂六充分溶解待用，用不完的试剂 4℃ 避光保存。

试剂六：液体 25mL×1 瓶，4℃保存。

试剂七：液体 3mL×1 瓶，4℃保存。

试剂八：液体 2.5mL×1 瓶，4℃避光保存。

酶液提取：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水，进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，弃上清，留沉淀。沉淀中加入 1mL 提取液，混匀后 90℃水浴 2h，冷却至室温，10000g 4℃离心 10min，取上清待测。

测定操作表：

1. 甲醇生成量测定：

试剂名称（ μL ）	空白管	测定管
样本		50
提取液	50	
试剂一	25	25
混匀，室温静置 30min		
试剂二	25	25
试剂三	20	20
混匀，冰浴至紫色褪去，约需要 15-30min		
试剂四	20	20
水	60	60
试剂五	200	200
混匀，60℃反应 15min。取 200 μL 加入 96 孔板，测定 412nm 下吸光值 A		
测定与 A 空白。 $\Delta A1=A$ 测定-A 空白		

1. 半乳糖醛酸含量测定:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	25
试剂七	25
浓硫酸	400
0℃水浴 10min, 冷却至室温	
试剂八	20
充分混匀, 静置 10min 后取 200 μL 于 96 孔板测定 450nm 处吸光值 A1 与 400nm 吸光值 A2, $\Delta A2=A1-A2$ 。	

计算公式:

1. 甲醇生成量计算

标准曲线为 $y = 0.0298x + 0.009$, $R^2 = 0.9997$; x 为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y 为吸光值 $\Delta A1$ 。甲醇生成量 ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重) = $(A1 - 0.009) \div 0.0298 \div W \times V$ 样总

$$= 33.56 \times (A1 - 0.009) \div W$$

2. 半乳糖醛酸含量计算

标准曲线为 $y = 0.2585x - 0.1746$, $R^2 = 0.9986$; x 为标准品浓度, $\mu\text{mol/mL}$; y 为吸光值 $\Delta A2$ 。半乳糖醛酸 ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重) = $(A2 + 0.1746) \div 0.2585 \div W \times V$ 样总

$$= 3.87 \times (A2 + 0.1746) \div W$$

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

V 样总: 加入提取液体积, 1mL; W , 样本质量, g。