

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 2.5mL×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
混匀，室温反应 1h		
试剂五	200	200
混匀，60℃ 反应 15min。取 200μL 加入 96 孔板，测定 412nm 下吸光值 A 测定与 A 空白。△A1=A 测定-A 空白		

2. 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
70℃水浴 10min, 冷却至室温	
试剂八	20
充分混匀, 静置 10min 后取 200μL 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

标曲为 $y = 0.6303x - 0.0105$, $R^2 = 0.9993$; x 为标准品浓度, mg/mL; y 为吸光值 $\Delta A1$ 。

$$\begin{aligned} \text{甲醇生成量} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A1 + 0.0105) \div 0.6303 \div W \times V \text{ 样总} \div 32 \times 1000 \\ &= 49.58 \times (\Delta A1 + 0.0105) \div W \end{aligned}$$

2. 半乳糖醛酸含量计算

标准曲线为 $y = 2.2514x - 0.3763$, $R^2 = 0.9969$; x 为标准品浓度, mg/mL; y 为吸光值 $\Delta A2$ 。

$$\begin{aligned} \text{半乳糖醛酸} (\mu\text{mol/g 鲜重}) &= (\Delta A2 + 0.3763) \div 2.2514 \div W \times V \text{ 样总} \div 194 \times 1000 \\ &= 2.29 \times (\Delta A2 + 0.3763) \div W \end{aligned}$$

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; 32, 甲醇分子量;