果胶甲酯化程度试剂盒说明书

分光光度法 50T/48S

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、分光光度计、1mL 玻璃比色皿、恒温水浴锅、蒸馏水、硫酸。

试剂组成和配制

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：液体 4mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂四：液体 4mL×1 瓶，4℃避光保存。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃避光保存；临用前加入 32mL 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 35mL×1 瓶，4℃保存。

试剂七：液体 4mL×1 瓶，4℃保存。

试剂八：液体 3mL×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，10000g4℃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		150
提取液	150	
试剂一	75	75
混匀，室温静置 30min		
试剂二	75	75
试剂三	60	60
混匀，冰浴至紫色褪去，约需要 15-30min		
试剂四	60	60
水	180	180
混匀，室温反应 1h		
试剂五	600	600
混匀，60℃反应 15min。取 1mL 加入 1mL 玻璃比色皿，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	60
试剂七	60
浓硫酸	960
70℃水浴 10min，冷却至室温	
试剂八	48
充分混匀，静置 10min 后取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿测定 450nm 处吸光值 A1 与 400nm 吸光值 A2，△A2=A1-A2。	

计算公式

1.甲醇生成量计算

标曲为 y = 1.2606x - 0.0105，R^2 = 0.9993；x 为标准品浓度，mg/mL；y 为吸光值△A。

甲醇生成量（μmol/g 鲜重）=(ΔA1+0.0105) ÷1.2606÷W×V 样总÷32×1000

=24.79×(ΔA1+0.0105)÷W

2.半乳糖醛酸含量计算

标准曲线为 y = 4.5028x - 0.3763，R2 = 0.9969；x 为标准品浓度，mg/mL；y 为吸光值△A。

半乳糖醛酸（μmol/g 鲜重）=(ΔA2+0.3763) ÷ 4.5028÷W×V 样总÷194×1000

=1.14×(ΔA2+0.3763)÷W

果胶甲酯化程度（%）=甲醇生成量÷半乳糖醛酸含量×100%

V 样总：加入提取液体积，1mL；W，样本质量，g；32，甲醇分子量；