

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，甲醇被醇氧化酶转化为甲醛，与 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-三唑反应生成紫红色物质，在 550nm 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、95%乙醇、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 20mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体 12mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：液体 15mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂四：液体×1 瓶，-20℃ 保存。临用前加入 1.5mL 试剂三溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃ 保存；

试剂五：粉剂×2 瓶，4℃ 保存；临用前加入 3mL 试剂一充分溶解待用，现配现用。

试剂六：液体 3mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂七：液体 2.5mL×1 瓶，4℃ 避光保存。

样本前处理

称取约 0.1g 组织，加入 1mL95%乙醇，进行冰浴匀浆，10000g 4℃ 离心 10min，弃上清，留沉淀。沉淀中加入 1mL 蒸馏水，充分震荡混匀后，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		100
蒸馏水	100	
试剂一	100	100
混匀，室温静置 60min		
试剂二	100	100
充分混匀，取反应液待用		
反应液	100	100
试剂三	90	90
试剂四	10	10
混匀，37℃ 反应 10min，取反应液待用		

在 96 孔板中加入如下试剂

反应液	40	40
试剂五	40	40

震荡混匀，30℃下反应 30min		
蒸馏水	120	120
混匀，测定 550nm 下吸光值 A 测定与 A 空白。Δ 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
试剂六	25
置于冰浴中	
浓硫酸	400
70℃水浴 10min，冷却至室温	
试剂七	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，ΔA2=A1-A2。	

计算公式

1. 甲醇生成量计算

标曲为 $y = 0.3954x + 0.0011$, $R^2 = 0.9999$; x 为标准品浓度, μmol/mL; y 为吸光值 ΔA1。

甲醇生成量 (μmol/g) = (Δ A1-0.0011) ÷0.3954÷W×V 样总

$$=2.53 \times (\Delta A1-0.0011) \div W$$

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, μmol/mL; y 为吸光值 ΔA2。

半乳糖醛酸 (μmol/g) = (Δ A2+0.1746) ÷0.2585÷W×V 样总

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

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。