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， 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		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，△A2=A1-A2。	

计算公式

1.甲醇生成量计算

标曲为 y = 0.0298x + 0.009，R^2 = 0.9997；x 为标准品浓度， μmol/mL；y 为吸光值△A1。

甲醇生成量（μmol/g 鲜重）=（ ΔA1-0.009） ÷0.0298÷W×V 样总

=33.56×（ ΔA1-0.009）÷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△A2。

半乳糖醛酸（μmol/g 鲜重）=(ΔA2+0.1746) ÷0.2585÷W×V 样总

=3.87×(ΔA2+0.1746)÷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。