

离子结合型果胶 (ISP) 含量试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

注 意：正式测定前取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

果胶是构成细胞初生壁和中胶层的主要成分，主要由原果胶、果胶酸甲酯和果胶酸组成。果胶中含有半乳糖醛酸、乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸等，是许多高等植物细胞壁中含量最丰富的多糖成分，其独特的物理、化学性质影响着植物源食品的口感和品质。果胶间以 Ca^{2+} 桥及其他离子键、氢键、糖苷键、酯键和苯环偶联的方式交联，通过不同的抽提方法可以提取各种形式的果胶，如水溶性果胶 (WSP)、离子结合型果胶 (ISP) 和共价结合果胶 (CSP)。

测定原理：

利用带有螯合剂的酸溶液提取离子结合型果胶 (ISP)，采用咪唑比色法测定果胶含量。果胶水解成半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与咪唑试剂进行缩合反应，生成物质在 530 nm 处有最大吸收峰。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、80%乙醇、丙酮、浓硫酸（不允许快递）、研钵和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体 100mL×1 瓶，4℃保存。

试剂三：标准液 1mL×1 支，4℃保存。

试剂四：液体 5 mL×1 瓶，4℃保存；

样品的前处理：

- 1、细胞壁的提取：取约 0.3g 样本，加入 1mL 80%乙醇，室温快速匀浆，95℃水浴 20min，冷却至室温，4000g 25℃离心 10min，弃上清。沉淀加入 1.5mL 80%乙醇和丙酮各洗一遍（涡旋振荡 2min 左右，4000g 25℃离心 10min，弃上清即可），沉淀即为粗细胞壁，加入 1mL 试剂一（去除淀粉）浸泡 15 小时，4000g 25℃离心 10min，弃上清，将沉淀干燥，称重得细胞壁物质 (CWM)。
- 2、ISP 的提取：称取烘干的 CWM 3mg，加入 1mL 试剂二，充分匀浆(若烘干物质质地坚硬，可先研碎后再加入 1mL 试剂二匀浆，或者用匀浆器匀浆)。8000g 4℃离心 10min，取上清液待测。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 530nm 处，蒸馏水调零；试剂三和试剂四 37℃预热 10min 以上；

2、操作表：

试剂名称 (μL)	空白管	标准管	对照管	测定管
待测样本			50	50
试剂三		50		

蒸馏水	50		50	
试剂四	50	50		50

混匀

浓硫酸	400	400	400	400
-----	-----	-----	-----	-----

混匀，95℃水浴 5min 后，冷却至室温，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，530nm 处读取吸光值，空白管、标准管、对照管和测定管吸光值分别记为 A1、A2、A3 和 A4。若 A 大于 2，需将待测样本用蒸馏水稀释（可稀释 10 倍或 20 倍）。空白管和标准管只要做一管，每个测定管需设一个对照管。

ISP 含量计算：

$$\text{ISP 含量}(\text{mg/g 干重}) = (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times (\text{A4} - \text{A3}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V2}) \times \text{稀释倍数} \\ = 0.05 \times (\text{A4} - \text{A3}) \div (\text{A2} - \text{A1}) \div \text{W} \times \text{稀释倍数}$$

C 标准：标准管浓度，0.05mg/mL；V1：加入样本体积，0.05mL；V2：加入提取液体积，1mL；W：样本干重，g。

注意：最低检测限为 50μg/g 干重