

果胶甲酯化程度 (PMD)检测试剂盒说明书

(货号: BP10223W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

果胶甲酯化程度(PMD)决定了负电荷数量,这与植物根系细胞壁吸附重金属,抵御重金属毒害密切相关。细胞壁果胶含量和甲酯化程度影响着植物细胞壁对重金属毒害的抵御能力。

果胶甲酯键经皂化处理后释放出甲醇,甲醇在醇氧化酶作用下生成甲醛,接着与 2,4-戊二酮反应显色,该有色物质在 412nm 下有特定吸收峰;同时半乳糖醛酸在硫酸溶液中与咪唑进行缩合反应生成紫红色物质,该有色物质在 530nm 处有特征吸收峰。以甲醇生成量与半乳糖醛酸含量的比值计算得到果胶甲酯化程度 (PMD)。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底; 2. 加入 0.56mL 试剂三混匀溶解,分装-20℃冻存,禁止反复冻融。
试剂五	试剂 A 液体 1 支 试剂 B(空瓶)×2 瓶	4℃避光保存	1. 临用前吸取 7mL 的试剂六至一瓶试剂 B 中,再吸取 300μL 的试剂 A 至试剂 B 中,混匀溶解做为试剂五备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂七	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、乙醇、浓硫酸、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:取 0.1g 组织样本,加 1mL 的 80%乙醇,研磨匀浆,转移至 EP 管中,静置 10 分钟后于 4℃ 下 8000rpm 离心 10min,弃上清留沉淀。向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇,混匀,静置 10 分钟后于 4℃ 下 8000rpm 离心 10 min,弃上清留沉淀。再向沉淀中加入 1 mL 提取液,混匀,沸水浴 1 小时,流水冷却至室温,8000rpm,4℃离心 10min,弃沉淀,取上清液即样本待测。

②液体样本:可直接测定,或者适当稀释后测定。若浑浊,离心后取上清检测。

③细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 的 80%乙醇，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000rpm，25℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：80%乙醇（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

2.1：待检液制备：

试剂组分（μL）	测定管
样本	200
试剂一	250
混匀，室温孵育 30min，再加试剂二（约 9μL）调 PH 至 7-8 之间（用 PH 试纸检测即可），最后再用蒸馏水定容到 0.5mL。即得待检液。	

2.2.甲醇生成量测定：

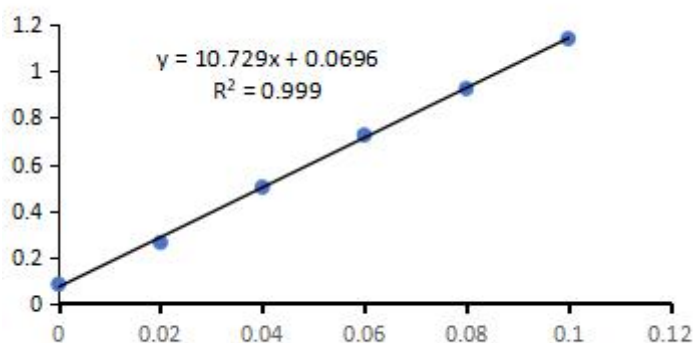
- ① 打开酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 412nm；
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
待检液	100	
蒸馏水		100
试剂三	90	90
试剂四	10	10
混匀，于 30℃条件下，孵育 20min		
试剂五	200	200
混匀，60℃条件下，孵育 15min。（若有明显的浑浊现象可于 8000rpm 室温离心 5min），取出 200μL 上清液至 96 孔板中，于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：若 ΔA 小于 0.01，可增加待检液加入量 V3（如由 100μL 增至 150μL，则试剂三相应减少），或者增加样本取样质量 W，则改变后的 V3 和 W 需代入公式重新计算。

③ 结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 10.729x + 0.0696$ ，x 为标准品浓度（μmol），y 是 ΔA 。



2、按照质量计算：

甲醇生成量(μmol/g)=[(ΔA-0.0696)÷10.729÷V3×V2÷V1×V]÷W×D

$$=2.33 \times (\Delta A - 0.0696) \div W \times D$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{甲醇生成量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0696) \div 10.729 \div V_3 \times V_2 \div V_1 \times V] \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 2.33 \times (\Delta A - 0.0696) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{甲醇生成量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0696) \div 10.729 \div V_3 \times V_2 \div V_1 \times V] \div V_1 \times D \\ &= 2.33 \times (\Delta A - 0.0696) \times D \end{aligned}$$

5、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{甲醇生成量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0696) \div 10.729 \div V_3 \times V_2 \div V_1 \times V] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= 2.33 \times (\Delta A - 0.0696) \div 500 \times D \end{aligned}$$

W---样本重量，g；
V1---样本体积，0.2mL；
V3---加入待检液体积，0.1mL；
500---细菌或细胞总数，500万；
Cpr---上清液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

V---加入提取液体积，1mL；
V2---待检液总体积，0.5mL；
D---稀释倍数，未稀释即为1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（0.5mmol/mL）：取 0.105mL 分析级甲醇（自备，Mr=32.04）至 4.9mL 蒸馏水中，混匀即得 0.5mmol/mL 甲醇标准品母液。（现配现用）。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5mmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mmol/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品母液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标准品	100	
蒸馏水		100
试剂三	90	90
试剂四	10	10
混匀，于 30℃条件下，孵育 20min		
试剂五	200	200
混匀，60℃条件下，孵育 15min。（若有明显的浑浊现象可于 8000rpm 室温离心 5min），取出 200μL 上清液至 96 孔板中，于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		

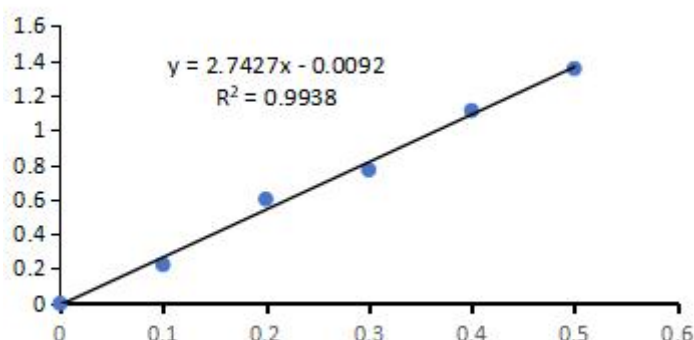
2.3.半乳糖醛酸含量测定：

- ① 打开酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），调节波长至 530nm；
- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
待检液	70	
蒸馏水		70
浓硫酸	420	420
可用封口膜缠紧，85℃水浴 15min 后，流水冷却至室温。		
试剂七	14	14
混匀，室温（25℃）暗处反应 30min（间隔 10min 混匀一次），立即取出 200μL 于 96 孔中，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

③ 结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 2.7427x - 0.0092$ ，x 为标准品浓度（mg/mL），y 是 ΔA 。



- 2、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/g}$ 重量) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div W \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div W \times D$
- 3、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/mg prot}$) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div Cpr \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div Cpr \times D$
- 4、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol/ml}$) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \div 194.5 \times 10^3] \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \times D$
- 5、半乳糖醛酸含量($\mu\text{mol}/10^4$ cell) $= [(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V2 \div V1 \times V \div 194.5 \times 10^3] \div 500 \times D$
 $= 4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div 500 \times D$

W---样本重量，g；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---样本体积，0.2mL；

V2---待检液总体积，0.5mL；

Mr---半乳糖醛酸分子量，194.5；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

500---细菌或细胞总数，500 万；

Cpr---上清液蛋白质浓度（mg/mL），建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（5mg/mL）：临用前向标准品中加入 2mL 蒸馏水（现配现用）。
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 100uL，加入 900μL 蒸馏水，混匀得到 0.5. mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	20	40	60	80	100
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	70	
蒸馏水		70
浓硫酸	420	420
可用封口膜缠紧，85℃水浴 15min 后，流水冷却至室温。		
试剂一	14	14
混匀，室温（25℃）暗处反应 30min（间隔 10min 混匀一次），立即取出 200μL 于 96 孔中，于 530nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		

3. 果胶甲酯化程度(PMD)结果计算：

果胶甲酯化程度(PMD) (%) = 甲醇生成量 ÷ 半乳糖醛酸含量 × 100%