

原果胶含量试剂盒说明书

(货号: BP10406W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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等形式广泛分布于植物果实、根茎和叶中。果胶和纤维素以及金属离子等物质相结合形成不溶于水的原果胶, 他的存在使果实显得坚实、脆硬。

本试剂盒先提取得到原果胶, 采用咪唑比色法测定原果胶含量。即原果胶在稀酸中水解为可溶性果胶, 并进一步转化为半乳糖醛酸, 在硫酸溶液中与咪唑进行缩合反应, 生成紫红色物质, 经光谱扫描该物质在 530nm 处有最大吸收峰, 颜色深浅与果胶含量成正比, 进而得原果胶含量。

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 120 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	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(烘干且过筛后的粉末组织可取 0.01g), 加 1.5mL 的 80%乙醇, 研磨匀浆, 85℃水浴 10min(及时补充 80%乙醇至 1.5mL), 取出流水冷却后, 8000rpm, 25℃离心 10min, 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇, 混匀, 85℃水浴 10min(及时补充 80%乙醇至 1mL), 取出流水冷却后, 8000rpm, 25℃离心 10min, 弃上清, 留沉淀。再向沉淀中加入 1 mL 蒸馏水, 混匀, 50℃水浴 30min, 流水冷却至室温, 8000rpm, 25℃离心 10min, 弃上清, 留沉淀。向沉淀中加入 1mL 提取液, 混匀, 95℃水浴 60min, 流水冷却至室温, 8000rpm, 25℃离心 10min, 取上清液待测。
- 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 1.5mL 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); 12000rpm 4℃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(10^4): 80%乙醇(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上(等仪器过自检程序亦可), 调节波长为 530nm;
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释(如 4 倍, 即 1 份上清液+3 份蒸馏水), 确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	70	
蒸馏水		70
浓硫酸	420	420
可用封口膜缠紧, 85°C水浴 15min 后, 流水冷却至室温。		
试剂一	14	14
混匀, 室温 (25°C) 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, $\Delta A = A - \text{测定} - A - \text{空白}$ 。		

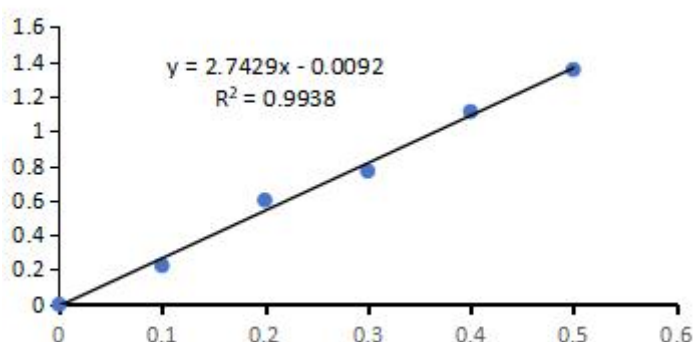
【注】：1、浓硫酸必须是分析纯级别, 且不能长期开口放置, 否则影响显色结果。另外浓硫酸具有强腐蚀性, 操作时需特别注意, 85°C加热取出后冷却再打开盖子, 以防液体飞溅烧伤。

2、显色反应必须在暗处反应, 否则颜色很快消失或者变淡, 影响吸光值。

3、若 A 测定管值大于 1.8, 可用蒸馏水稀释样本即待检测上清液, 则稀释倍数 D 需代入公式计算; 或若 A 值再零附近可增加样本取样质量 W。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 2.7429x - 0.0092, x 为标准品浓度 (mg/mL), y 是 ΔA 。



2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{原果胶含量 (mg/g)} &= [(\Delta A + 0.0092) \div 2.7429 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.365 \times (\Delta A + 0.0092) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{原果胶含量 (mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0092) \div 2.7429 \times V_1] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D \\ &= 0.365 \times (\Delta A + 0.0092) \div C_{pr} \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{原果胶含量 (mg/mL)} &= [(\Delta A + 0.0092) \div 2.7429 \times V_1] \div V_1 \times D \\ &= 0.365 \times (\Delta A + 0.0092) \times D \end{aligned}$$

5、按细菌/细胞密度计算：

$$\begin{aligned} \text{原果胶含量 (mg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0092) \div 2.7429 \times V_1] \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= 0.365 \times (\Delta A + 0.0092) \div 500 \times D \end{aligned}$$

W---样本重量, g; V---加入提取液体积, 1mL;
 V1---加入样本体积, 0.07mL; D---稀释倍数, 未稀释即为 1。
 500---细胞数量, 万;
 Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 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 900uL 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	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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。在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (uL)	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°C 水浴 15min 后, 流水冷却至室温。		
试剂一	14	14
混匀, 室温 (25°C) 暗处反应 30min (间隔 10min 混匀一次), 立即取出 200uL 于 96 孔中, 于 530nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		