

## 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  $\text{Ca}^{2+}$  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:**

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

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

