

离子结合型果胶(ISP)检测试剂盒（微量法）

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：

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），采用吡啶比色法测定果胶含量。果胶水解成半乳糖醛酸，在硫酸溶液中与吡啶试剂进行缩合反应，生成物质在 530 nm 处有最大吸收峰。

试剂组成和配制：

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、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:

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

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。

注意事项:

最低检测限为 50μg /g 干重。