

共价结合型果胶(CSP)含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-GH012-96 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。果胶间以 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、氢键、糖苷键、酯键等方式与其他物质交联, 通过特异的提取方式可以提取得到离子结合型果胶 (ISP) 和共价结合果胶 (CSP)。

本试剂盒用螯合剂的碱溶液特异提取共价结合型果胶 (CSP), 采用硫酸-咔唑比色法测定果胶含量。果胶水解为半乳糖醛酸, 在硫酸溶液中与咔唑进行缩合反应, 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, 进而得共价结合型果胶含量。

二、测试盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液 A	液体 120 mL×1 瓶	4°C避光保存	
提取液 B	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 1.5mL×1 支	4°C避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4°C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 0.02g), 加 1.5mL 的 80%乙醇, 研磨匀浆, 85°C水浴 10min, 取出流水冷却后, 8000rpm, 25°C10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇震荡混匀 2min, 85°C水浴 10min, 取出流水冷却后, 8000rpm, 25°C10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。加入 1mL 的提取液 A, 90°C水浴 15min (间隔 3min 晃动一次), 8000rpm, 室温 (25°C) 离心 10min, 弃上清, 留沉淀, 向沉淀中加入 1mL 丙酮振荡混匀, 8000rpm, 室温 (25°C) 离心 10min, 弃上清, 留沉淀, (注:若色素仍很多, 继续用丙酮提取 1-2 次), 打开 EP 管置于 90°C孵育 20min, 使沉淀干燥。向沉淀中加入 1mL 提取液 B, 室温 (25°C) 震荡提取 1 小时后, 8000rpm, 25°C离心 10min, 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); 8000rpm, 25°C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;

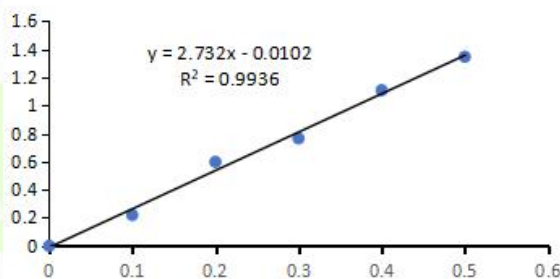
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释（如 4 倍，即 1 份上清液+3 份蒸馏水），确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

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： $y = 2.732x - 0.0102$ ，x 为标准品浓度 (mg/mL)，y 是 ΔA 。



- 2、共价结合型果胶(mg/g)=[$(\Delta A + 0.0102) \div 2.732 \times V_1$] $\div (W \times V_1 \div V) \times D$
 $= 0.366 \times (\Delta A + 0.0102) \div W \times D$
- 3、按蛋白浓度计算：
 共价结合型果胶(mg/mg prot)=[$(\Delta A + 0.0102) \div 2.732 \times V_1$] $\div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times D$
 $= 0.366 \times (\Delta A + 0.0102) \div C_{pr} \times D$
- 4、按照液体体积计算：
 共价结合型果胶(mg/mL)=[$(\Delta A + 0.0102) \div 2.732 \times V_1$] $\div V_1 \times D$
 $= 0.366 \times (\Delta A + 0.0102) \times D$
- 5、按细菌/细胞密度计算：
 共价结合型果胶(mg/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0102) \div 2.732 \times V_1$] $\div (V_1 \div V \times 500) \times D$
 $= 0.366 \times (\Delta A + 0.0102) \div 500 \times D$

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。		