

## 果胶甲酯化程度(PMD) 检测试剂盒说明书

(货号: BN27926 微板法48样)

### 一、产品简介:

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吡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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 μL×1支	-20℃保存	用前轻甩几下使液体落入底部,再加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 μL×1支 试剂B(空瓶)×2瓶	4℃保存	临用前吸取7mL的试剂六至一瓶试剂B中,再吸取15 μL的试剂A至试剂B中,混匀溶解做为试剂五备用。
试剂六	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂七	液体1.5mL×1支	4℃保存	
标准品	粉剂mg×1支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、水浴锅、可调式移液器、乙醇、浓硫酸、研钵。

### 四、果胶甲酯化程度(PMD) 检测:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

#### 1、样本制备:

- ① 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。
- ② 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10min,弃上清留沉淀。
- ③ 再向沉淀中加入1mL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、检测步骤:

##### 2.1:待检液制备:

试剂名称(μL)	测定管
样本	200
试剂一	250
混匀,室温孵育30min,再加试剂二(约9 μL)调	

本产品仅用于科研

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:

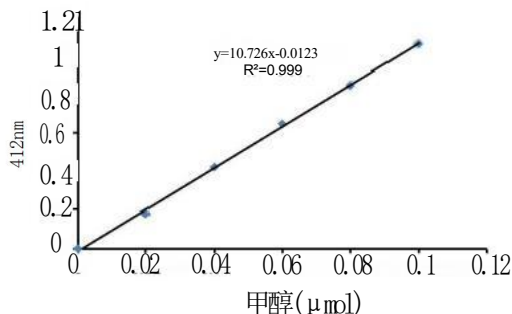
- ①打开酶标仪, 调节波长至412nm;
- ② 在EP 管中依次加入:

试剂名称 (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200 μL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 $\Delta A$  小于0.01, 可增加待检液加入量V3 (如由100 μL增至150 μL, 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:  $y = 10.726x - 0.0123$ , x 为标准品浓度 (μmol), y 是 $\Delta A$ 。



$$2、\text{甲醇生成量} (\mu\text{mol/g}) = [(\Delta A + 0.0123) \div 10.726 \div V3 \times V2 \div V1 \times V] \div W \times D$$

$$= 2.33 \times (\Delta A + 0.0123) \div W \times D$$

- |                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| 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; |
| V3---加入待检液体积, 0.1mL; | D---稀释倍数, 未稀释即为1。   |

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (0.5mmol/mL): 取0.105mL 分析级甲醇 (自备,  $M_r = 32.04$ ) 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)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据2.2步骤中的测定管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线

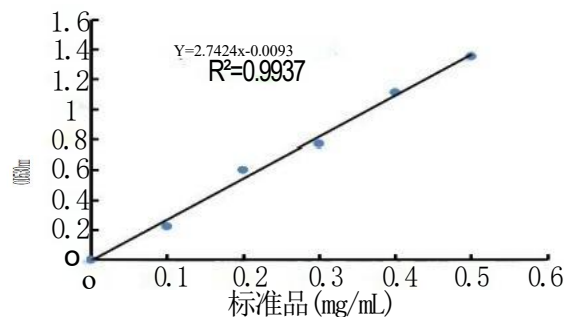
### 2.3. 半乳糖醛酸含量测定:

- ①打开酶标仪, 调节波长至530nm;  
② 在EP 管中依次加入:

试剂名称(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:  $y = 2.7424x - 0.0093$ , x 为标准品浓度(mg/mL), y 是 $\Delta A$ 。



2、半乳糖醛酸含量( $\mu\text{mol/g}$ 重量) =  $\frac{(\Delta A + 0.0093) \div 2.7424 \times V_2 \div V_1 \times V \div 194.5 \times 10^3}{W \times D}$   
=  $4.69 \times (\Delta A + 0.0093) \div W \times D$

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。

附: 标准曲线制作过程:

1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)。

2把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. mg/mL。  
也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。

### 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 $\div$ 半乳糖醛酸含量 $\times 100\%$