

半纤维素含量试剂盒说明书

(货号: G0716W 微板法 96 样)

一、产品简介:

半纤维素是植物细胞壁中与纤维素紧密结合的多糖混合物,是构成细胞初生壁的主要成分,广泛存在于植物中,是一种新型可利用能源。

本试剂盒在美国NREL实验室的方法基础上略做改进以检测半纤维素含量,在酸性条件下加热使半纤维素水解生成木糖。通过比色法检测生成的木糖含量,进而计算出半纤维素含量。

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 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 mL×1 瓶	4℃保存	临用前再缓慢加入 20mL 浓硫酸,混匀备用。
试剂二	粉体 mg×6 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,加入 6mL 冰乙酸溶解,再缓慢加入 0.36mL 浓盐酸混匀;用不完的试剂避光 4℃保存两天。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	检测前从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中,再加 2mL 蒸馏水溶解即 1mg/mL 的木糖标准品,再用蒸馏水稀释一倍成 0.5mg/mL,备用。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、80%乙醇、丙酮、冰乙酸、浓硫酸、浓盐酸、蒸馏水。

四、半纤维素含量:

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 取适量组织样本烘干并磨碎,过 40 目筛备用;取 0.02g 过筛的粉末组织(若是鲜样可取 0.05g,水分充足样本可取 0.1g),加 1.5mL 的 80%乙醇,研磨匀浆,50℃水浴 20min(间隔 3min 晃动几下),取出流水冷却后,12000rpm,25℃10min,弃上清,留沉淀(尽量保留沉淀)。
- ② 向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇震荡混匀 2min,50℃水浴 20min(间隔 3min 晃动几下),取出流水冷却后,12000rpm,25℃10min,弃上清,留沉淀(尽量保留沉淀)。
- ③ 加入 1mL 的提取液(去淀粉),90℃水浴 15min(间隔 3min 晃动一次),12000rpm,室温(25℃)离心 10min,弃上清,留沉淀,向沉淀中加入 1mL 丙酮振荡混匀,12000rpm,室温(25℃)离心 10min,弃上清,留沉淀,(注:若色素仍很多,继续用丙酮提取 2-3 次),打开 EP 管置于 90℃孵育 20min,使沉淀干燥。
- ④ 在沉淀(若用组织研磨机研磨的样本,务必去掉钢珠等耗材,仅留待检测的样本沉淀)中加入 0.2mL 试剂一(注:尽量避免沉淀样本粘在管壁上,并密封管口),30℃水浴 1 小时后,倒入 10mL 离心管中,再用 5.6mL 蒸馏水分次涮洗 2mLEP 管并收集液体至上述 10mL 离心管中,混匀(或于振荡器上振荡使固体分散),密封管口;然后于 110℃孵育 1 小时,取出冷却,混匀后可取 1mL 混合液至 2mLEP 管中,于 8000rpm,

室温离心 5min，取上清液待测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 460nm。
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释（如 2 倍，即 1 份上清液+1 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（μL）	测定管	标准管 （仅做一次）	空白管 （仅做一次）
样本	60		
标准品		60	
蒸馏水			60
试剂二	300	300	300

混匀，沸水浴（95℃）水浴 8min（精确时间；防止水份散失，可用封口膜缠紧），冷却后取 200μL 至 96 孔板中，于 460nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

【注】若 A 测定值大于 1，可用蒸馏水进一步稀释样本（即上清液），稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本干重计算：

$$\text{半纤维素(mg/g 重量)} = (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times 0.9 \times D \\ = 2.61 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

$$\text{半纤维素含量(\%)} = \{ (C_{\text{标准}} \times V_1) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times 0.9 \times D \times 10^{-3} \times 100 \} \% \\ = [0.261 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D] \%$$

C 标---0.5mg/mL；

V1---加入样本体积，0.06mL；

0.9---缩合成半纤维素的换算系数；

V---加入提取液体积，5.8mL；

W---取样质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。