

半纤维素含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX033 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, 进而计算得出半纤维素含量。

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°C保存	
试剂一	液体 1 瓶	4°C保存	临用前再缓慢加入 20mL 浓硫酸, 混匀备用。
试剂二	粉体 6 瓶	4°C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°C 保存两天。
标准品	粉体 1 支	4°C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°C水浴 20min (间隔 3min 晃动几下), 取出流水冷却后, 12000rpm, 25°C10min, 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°C水浴 20min (间隔 3min 晃动几下), 取出流水冷却后, 12000rpm, 25°C10min, 弃上清, 留沉淀 (尽量保留沉淀)。
- ③ 加入 1mL 的提取液 (去淀粉), 90°C水浴 15min (间隔 3min 晃动一次), 12000rpm, 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, 12000rpm, 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 2-3 次), 打开 EP 管置于 90°C 孵育 20min, 使沉淀干燥。
- ④ 在沉淀中加入 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°C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, 密封管口; 然后放入 110°C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°C, 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：

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

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

C 标---0.5mg/mL；

V---加入提取液体积，5.8mL；

V1---加入样本体积，0.06mL；

W---取样质量，g；

0.9---缩合成半纤维素的换算系数；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。