

半纤维素含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX033 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、 指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 1 瓶	4℃保存	1. 临用前再缓慢加入 20mL 浓硫酸, 混匀备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 6 瓶	4℃避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 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 1 支	4℃保存	1. 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; 2. 再用蒸馏水稀释一倍成 0.5mg/mL, 备用。

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、0%乙醇、丙酮、冰乙酸、浓硫酸、浓盐酸、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)。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)。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。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℃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℃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 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 1mL 提取液, 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,

室温离心 5min, 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): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可), 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°C) 水浴 8min (精确时间; 防止水份散失, 可用封口膜缠紧), 冷却后取 200 μL 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:

$$\begin{aligned} \text{半纤维素}(\text{mg/g 重量}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times 0.9 \times \text{D} \\ &= 2.61 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{半纤维素含量}(\%) &= \{(\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1} \div \text{V}) \times 0.9 \times \text{D} \times 10^{-3} \times 100\} \% \\ &= [0.261 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times \text{D}] \% \end{aligned}$$

2、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{纤维素含量}(\text{mg/mg prot}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{Cpr} \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ &= 2.61 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{Cpr} \times \text{D} \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算:

$$\begin{aligned} \text{纤维素含量}(\text{mg/mL}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{V1} \times \text{D} \\ &= 2.61 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \times \text{D} \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算:

$$\begin{aligned} \text{纤维素含量}(\text{mg}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V1}) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{V1} \div \text{V} \times 500) \times \text{D} \\ &= 2.61 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D} \end{aligned}$$

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。

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。