

## 半纤维素含量试剂盒说明书

(货号: G0716W48 微板法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 mL×1 瓶	4°C保存	临用前再缓慢加入 10mL 浓硫酸,混匀备用。
试剂二	粉体 mg×3 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 mg×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(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°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;然后于 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（ $\mu\text{L}$ ）	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 $\mu\text{L}$  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 1.5，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：

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

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

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。