

半纤维素含量试剂盒说明书

(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 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 1.5，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。