纤维素（CLL）含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

纤维素是由葡萄糖组成的大分子多糖，通常与半纤维素、果胶和木质素结合在一起，是植物细胞壁的主要结构成分。纤维素是一种重要的膳食纤维，是自然界中分布最广、含量最多的一种多糖。

测定原理：

纤维素为β－葡萄糖残基组成的多糖，在酸性条件下加热能分解成β－葡萄糖。β－葡萄糖在强酸作用下，可脱水生成β－糠醛类化合物。β－糠醛类化合物与蒽酮脱水缩合，生成糠醛衍生物。颜色的深浅可间接定量测定纤维素含量。

组成：

产品名称	GMS041-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	4℃
试剂二：粉剂	1 瓶	4℃避光
试剂三：液体	10ml	4℃
说明书	一份	

自备仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、80％乙醇、丙酮、浓硫酸（不允许快递）、研钵和蒸馏水。

样品的前处理：

1、**细胞壁的提取：**取约 0.3g 样本，加入 1ml 80％乙醇，室温快速匀浆，90℃水浴 20min（加热过程中 EP 管可能爆开，建议用胶带封口或使用防爆 EP 管），冷却至室温，6000g 25℃离心 10min，弃上清。沉淀加入 1.5ml80％乙醇和丙酮各洗一遍（涡旋振荡 2min 左右，6000g 25℃离心 10min，弃上清即可），沉淀即为粗细胞壁，加入 1ml 试剂一（去除淀粉）浸泡 15 小时，6000g 25℃离心 10min，弃上清，将沉淀干燥，称重得细胞壁物质（CWM）。

2、**纤维素的提取：**称取烘干的 CWM 约 5mg，加入 0.5ml 蒸馏水充分匀浆(若烘干物质质地坚硬，可先研碎后再加入 0.5ml 蒸馏水匀浆，或者用匀浆器匀浆)，匀浆液转移至 EP 管中，用蒸馏水定容至 0.5ml，置于冰水浴中，缓慢加入 0.75ml 浓硫酸，混匀，冰水浴中静置 30min。8000g 4℃离心 10min，取上清液，用蒸馏水稀释 20 倍后待测。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 620nm，蒸馏水调零。
2、调节水浴锅至 95 度。
3、工作液的配制：在试剂二中加入 4ml 试剂三，充分溶解，如较难溶解，可加热搅拌；用不完的试剂 4℃保存一周；

4、加样表（在 EP 管中反应）：

试剂（μl）	空白管	测定管
样本		150
蒸馏水	150	
工作液	35	35
浓硫酸	315	315

混匀，置 95 度水浴中 10min（盖紧，以防止水分散失），冷却至室温后，取 200μl 至微量石英比色皿或 96 孔板中，于 620nm 处，分别读取空白管和测定管吸光值，ΔA=A 测定管-A 空白管。
注意：
1、空白管只要做一管。
2、由于浓硫酸具有强腐蚀性，请谨慎操作。

纤维素含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 y = 7.875x - 0.0043；x 为标准品浓度（mg/ml），y 为吸光值。
2、按样本质量计算：
纤维素（mg /g 干重）= [(ΔA + 0.0043) ÷7.875×V1]÷（W×V1÷V2）×20=3.17×(ΔA + 0.0043) ÷W。
V1：加入样本体积，0.15ml；V2：加入提取液体积，1.25ml；W：样本干重，5×10^{-3}g；20：样本稀释倍数。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定的回归方程为 y = 5.25x - 0.0043；x 为标准品浓度（mg/ml），y 为吸光值。
2、按样本质量计算：
纤维素（mg /g 干重）= [(ΔA + 0.0043) ÷5.25×V1]÷（W×V1÷V2）×20=4.76×(ΔA + 0.0043) ÷W。
V1：加入样本体积，0.15ml；V2：加入提取液体积，1.25ml；W：样本干重，约 5×10^{-3}g；20：样本稀释倍数。
注意：最低检测限为 1mg/g 干重或 10ng/ mg prot

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利