

纤维素（CLL）含量检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4280

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 200 mL×1 瓶（自备）	2-8℃保存
提取液二	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	粉剂×2 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

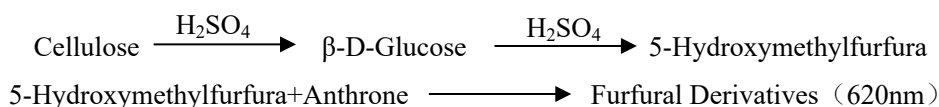
溶液的配制：

- 1、提取液一：80%乙醇 200 mL，即将 160 mL 无水乙醇和 40 mL 蒸馏水混合，自备。提供一个 125 mL 空瓶。
- 2、标准品：10 mg 葡萄糖。临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解，配成 10 mg/mL 葡萄糖溶液备用，2-8℃保存两周。
- 3、工作液的配制：取一瓶试剂一中加入 2.5 mL 试剂二，充分混匀，如较难溶解，可充分震荡或加热搅拌；用不完的试剂可以 2-8℃保存一周。

产品说明：

纤维素是由β-D-葡萄糖单元以 β-1,4-糖苷键连接而成的直链多聚体，通常与半纤维素、果胶及木质素结合在一起，是植物细胞壁的主要结构成分。以纤维素为原料的产品广泛应用于食品、造纸、塑料、炸药、电工及科研器材等领域。

纤维素在酸性条件下加热能分解成β-D-葡萄糖。在强酸作用条件下利用与蒽酮显色剂测定纤维素含量。



技术指标：

最低检出限：0.0023 mg/mL

线性范围：0.003125-0.09 mg/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式低温离心机、水浴锅、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰盒、丙酮、浓硫酸、无水乙醇、蒸馏水和EP管。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细胞壁物质（CWM）的提取：

- (1) 称取约 0.3g（记为 W1）样本，加入 1mL 提取液一，室温快速匀浆，90℃水浴 20min，冷却至室温，6000g，25℃离心 10min，弃上清。
- (2) 沉淀先后用 1.5mL 提取液一和丙酮各洗两遍（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。
- (3) 在粗细胞壁中加入 1mL 提取液二（去除淀粉）浸泡 15 小时，6000g，25℃离心 10min，弃上清，将沉淀用蒸馏水清洗两遍（涡旋振荡 2min 左右，6000g，25℃离心 10min，弃上清即可），之后干燥沉淀（60-100℃均可），得到细胞壁物质（CWM），称重记为 W2。

2、纤维素的提取：

- (1) 称取烘干的 CWM 约 5mg（记为 W3），加入 0.5mL 蒸馏水充分匀浆，匀浆液转移至 EP 管中，用蒸馏水定容至 0.5mL。
- (2) 将定容后的匀浆液置于冰水混合物中，缓慢加入 0.75mL 浓硫酸，缓慢混匀，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。

注意：1. 若样本或者干燥后的沉淀质地坚硬，可以先研碎再进行后续步骤

2. 在提取纤维素的过程中，首先，置于冰水浴中的 EP 管需要固定，不要上下左右浮动，一方面保障自身安全，另一方面防止冰水混合物进入 EP 管造成试验误差；再者，加入浓硫酸时，建议枪头伸入样本液面以下，缓慢加入，防止液面沸腾及样本碳化。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热30min以上，调节波长至620nm，蒸馏水调零。
- 2、将10mg/mL标准液用蒸馏水稀释为0.09、0.08、0.07、0.05、0.025、0.0125、0.00625mg/mL的标准溶液备用。
- 3、标准品稀释表

序号	稀释前浓度（mg/mL）	标准液体积（ μ L）	蒸馏水体积（ μ L）	稀释后浓度（mg/mL）
1	10	50	4950	0.1
2	0.1	450	50	0.09
3	0.1	400	100	0.08
4	0.1	350	150	0.07
5	0.1	500	500	0.05
6	0.05	500	500	0.025
7	0.025	500	500	0.0125
8	0.0125	500	500	0.00625

实验中每个标准管需300 μ L标准溶液。

4、操作表（在1.5mL离心管中）：

试剂名称（ μ L）	测定管	标准管	空白管
样本	300	-	-
标准溶液	-	300	-
蒸馏水	-	-	300
工作液	70	70	70
浓硫酸	630	630	630

混匀，置 95°C 水浴 10min（盖紧，防止水分散失），取出后冷却至室温，测定 620nm 处吸光值 A，分别记为 A 测定管，A 标准管，A 空白管。计算 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}$ ， $\Delta A \text{ 标准} = A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}$ 。（空白管及标准曲线均只需检测 1-2 次）

三、纤维素含量计算

1、标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x, mg/mL）和吸光度 ΔA 标准（y, ΔA 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 ΔA （y, ΔA ）带入公式计算样本浓度（x, mg/mL）

2、纤维素含量的计算：

（1）按样本质量计算

$$\text{纤维素 (mg/g 质量)} = x \times V_{\text{提取}} \times 20 \times (W2 \div W3) \div W1 \div 1.11 = 22.52 \times x \times W2 \div W3 \div W1$$

（2）按样本细胞壁物质（CWM）质量计算

$$\text{纤维素 (mg/g 干重)} = x \times V_{\text{提取}} \times 20 \div W3 \div 1.11 = 22.52x \div W3$$

1.11：是此法测得葡萄糖含量换算为纤维素含量的常数，即 111 μg 葡萄糖用蒽酮试剂显色相当于 100 μg 纤维素蒽酮试剂所显示的颜色；V 提取：纤维素提取液体积，1.25mL（0.5mL 蒸馏水+0.75mL 浓硫酸）；20：样本稀释倍数；W1：样本质量，0.3g；W2：样本细胞壁物质（CWM）质量，g；W3，提取纤维素时称取的细胞壁物质（CWM）质量，g。

注意事项：

- 1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。
- 2、浓硫酸具有强腐蚀性，操作时各个步骤均需特别注意：纤维素提取在加入浓硫酸时，建议枪头伸入样本液面以下，缓慢加入，以防止液体飞溅烧伤；95°C 水浴结束取出后需冷却至室温再打开 EP 管盖，以防液体飞溅烧伤。
- 3、由于试剂二挥发性强且具有刺激性气味，建议在通风橱中进行工作液的配制。

实验实例：

1. 取 0.3g 康乃馨叶片样本提取细胞壁物质（CWM）0.02g，称取烘干的 CWM 约 5mg（记为 W3），提取纤维素，取上清液，用蒸馏水稀释 20 倍后进行检测，测得计算 $\Delta A = A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管} = 0.821 - 0.051 = 0.77$ ，标准曲线 $y = 13.994 + 0.0072x$ ，计算 $x = 0.0545$ ，按样本质量计算得：
纤维素（mg/g 质量）= $22.52 \times x \times W2 \div W3 \div W1 = 16.3645 \text{ mg/g 质量}$ 。

相关系列产品：

- BC3330/BC3335 糖原合成酶（GCS）活性检测试剂盒
- BC3360/BC3365 UDPG 焦磷酸化酶（UGP）活性检测试剂盒
- BC4440/BC4445 半纤维素含量检测试剂盒

