

### 纤维素（CLL）含量试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前取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。

需自备的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体100mL× 1瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1瓶，4℃避光保存。

试剂三：液体10mL× 1支，4℃保存。

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1.5mL 80%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。

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（ $\mu\text{L}$ ）	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200 $\mu$ L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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

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）=  $[(\Delta A + 0.0043) \div 7.875 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times 20 = 3.17 \times (\Delta A + 0.0043) \div W$ 。

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 $\times$ 10<sup>-3</sup>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）=  $[(\Delta A + 0.0043) \div 5.25 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times 20 = 4.76 \times (\Delta A + 0.0043)$

$\div W$ 。

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 $\times$ 10<sup>-3</sup>g；20：样本稀释倍数。

**注意：最低检测限为1mg/g干重或10ng/ mg prot**