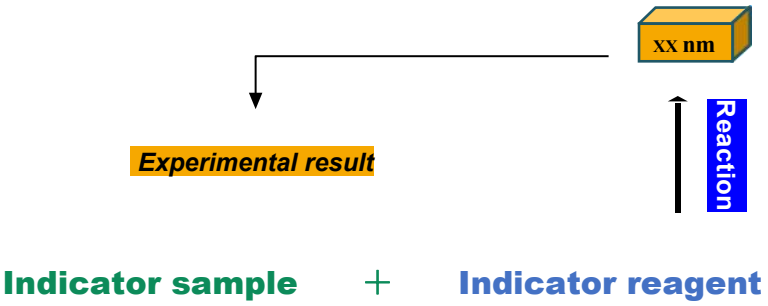
上海茁彩生物科技有限公司

Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0876 规格：100管/96样

纤维素（CLL）含量试剂盒说明书说明书

微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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一葡萄糖残基组成的多糖，在酸性条件下加热能分解成β一葡萄糖。β一葡萄糖在强酸作用下，可脱水生成β一糠醛类化合物。β一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：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、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：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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	
标准品	粉剂×10mg支	4℃保存	含10mg无水葡萄糖（干燥失重<0.2%），临用前加入1mL蒸馏水溶解，配制成10mg/mL葡萄糖溶液备用，4℃可保存1周，或者用饱和苯甲酸溶液溶解，可保存更长时间。

样品的前处理：

1、细胞壁的提取：取约 0.3g 样本（计为m1），加入 1mL 80%乙醇，室温快速匀浆，95℃水浴 20min，冷却至室温，4000g 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，4000g 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，4000g 25℃离心 10min，弃上清，1mL 80%乙醇洗涤两次，弃上清，将沉淀干燥，称重得细胞壁物质（CWM质量计为m2）。

2、纤维素的提取：称取烘干的 CWM 约 5mg（计为W），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，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。

标准溶液准备：

将 10mg/mL 葡萄糖标准液进行二倍稀释得到 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156mg/mL 标准溶液备用。

测定步骤：

1、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）	标准管	测定管
样本		150
标准品	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，于 620nm 处读数。

纤维素含量计算：

1、标准曲线绘制：

以 0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.003125、0.00156mg/mL 葡萄糖标准溶液为横坐标，ΔA 为纵坐标绘制标准曲线，得到线性回归方程 y=kx+b，将ΔA′代入方程得到 x（mg/mL）；

2、按细胞壁干重计算

纤维素含量(mg/mg 鲜重)=x×稀释倍数×V 提取÷W

3、按总样本质量计算

纤维素含量(mg/mg 鲜重)=x×稀释倍数×V 提取÷W×（m2÷m1）

V 提取：提取后体积，1.25mL；W：样品质量，mg；稀释倍数：20；m1：总样本质量，g；m2：细胞壁物质CWM，g

注意事项

1. 加热过程中有剧烈反应，震荡时轻摇，以免压力过大喷出造成人身伤害。
2. 浓硫酸具有强腐蚀性，建议戴防护手套操作。
3. 如样本OD值大于1.5，可在纤维素提取过程中扩大稀释倍数，计数过程中乘以对应的稀释倍数。