

纤维素（CLL）含量检测试剂盒（微量法）

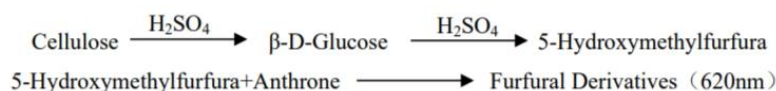
产品货号: BA2004

产品规格: 100T/96S

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: 0.0037mg/mL

线性范围: 0.00391-0.3mg/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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体400mL×1瓶（自备）	2-8℃
提取液二	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	粉剂×2瓶	2-8℃
试剂二	液体10mL×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

溶液的配制:

- 提取液一: 80%乙醇400mL, 即将320mL无水乙醇和80mL蒸馏水混合, 自备。提供一个125mL空瓶。
- 标准品: 10mg葡萄糖。临用前加入1mL蒸馏水溶解, 配成10mg/mL葡萄糖溶液备用, 2-8℃保存两周。
- 工作液的配制: 取一瓶试剂一中加入2.5mL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。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式低温离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、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（仅供参考）:

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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- (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°C 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°C 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°C 离心 10min，弃上清即可），之后干燥沉淀（60-100°C 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°C 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/酶标仪预热 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 0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078、0.0039mg/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 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度(mg/mL)
1	10	100	950	1
2	1	50	350	0.125
3	0.125	200	200	0.0625
4	0.0625	200	200	0.03125
5	0.03125	200	200	0.015625
6	0.015625	200	200	0.0078
7	0.0078	200	200	0.0039

实验中每个标准管需 150μL 标准溶液。

4. 操作表（在 1.5mL 离心管中进行下列操作）：

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	150	-	-
标准溶液	-	150	-
蒸馏水	-	-	150
工作液	35	35	35
浓硫酸	315	315	315

混匀，置 95°C 水浴 10min（盖紧，防止水分散失），取出后冷却至室温，吸取 200 μL 于 96 孔板中或者微量玻璃比色皿中测定 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)。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

实验案例:

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, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.538 - 0.061 = 0.477$, 标准曲线 $y = 8.3536x + 0.0388$, 计算 $x = 0.05246$, 按样本质量计算得:
纤维素 (mg/g 质量) = $22.52 \times x \times W2 \div W3 \div W1 = 15.752 \text{ mg/g 质量}$ 。
2. 取 0.3g 黑麦草样本提取细胞壁物质 (CWM) 0.04g, 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, 用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}} = 0.666 - 0.061 = 0.605$, 标准曲线 $y = 8.3536x + 0.0388$, 计算 $x = 0.06778$, 按样本质量计算得:
纤维素 (mg/g 质量) = $22.52 \times x \times W2 \div W3 \div W1 = 40.704 \text{ mg/g 质量}$ 。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com