



## 纤维素含量检测试剂盒

### Cellulose Assay Kit

微量法

产品编号: AK395M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK395-A	100mL×1瓶	4℃保存
AK395-B	粉剂×1瓶	4℃避光保存
AK395-C	10mL×1支	4℃保存
AK395-标准品	粉剂×1支	4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

**意义:** 纤维素 (Cellulose) 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。

**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。

自备用品:

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。

样本处理:

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 AK395-A (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. 将 AK395-标准品临用前加入 1 mL 蒸馏水溶解, 配成 10 mg/mL 标准溶液备用 (4℃保存两周), 再将 10mg/mL 标准液用蒸馏水稀释为 0.1、0.075、0.05、0.025、0.0125、0.00625 mg/mL 的标准溶液备用。
4. 工作液的配制: 在 AK395-B 中加入 4mL AK395-C, 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;
5. 样本测定 (在 EP 管中反应)

试剂名称	空白管 (μL)	测定管 (μL)	标准管 (μL)
样本		150	
蒸馏水	150		

标准液			150
工作液	35	35	35
浓硫酸	315	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，分别为 A 测定管，A 标准管，A 空白管；计算 $\Delta A = A$ 测定管 - A 空白管， $\Delta A$ 标准 = A 标准管 - A 空白管。			
<b>注意：</b>			
1、空白管及标曲只需做 1-2 次。			
2、由于浓硫酸具有强腐蚀性，请谨慎操作。			

### 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  $\Delta A$  标准 (y,  $\Delta A$  标准)，建立标准曲线。根据标准曲线，将  $\Delta A$  (y,  $\Delta A$ ) 带入公式计算样本浓度 (x, mg/mL)

#### 2. 纤维素含量的计算：

##### a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

##### (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  $\mu$ g 葡萄糖用蒽酮试剂显色相当于 100 $\mu$ g 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。

##### b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

##### (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  $\mu$ g 葡萄糖用蒽酮试剂显色相当于 100 $\mu$ g 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：

1. 由于浓硫酸具有强腐蚀性，请做好防护，谨慎操作；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 $^{\circ}$ 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。
2. 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。