

纤维素（CLL）含量检测试剂盒（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 -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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 保存。

试剂二：粉剂 \times 1 瓶，4 $^{\circ}$ C 避光保存。

试剂三：液体 10mL \times 1 支，4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存一周；
4. 加样表（在 EP 管中反应）：

试剂 (μL)	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 200μL 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

$$y = 7.875x - 0.0043; \quad x \text{ 为标准品浓度 (mg/mL), } y \text{ 为吸光值。}$$

2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{纤维素 (mg/g 干重)} &= [(\Delta A + 0.0043) \div 7.875 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times 20 \\ &= 3.17 \times (\Delta A + 0.0043) \div W \end{aligned}$$

V1: 加入样本体积, 0.15mL;

V2: 加入提取液体积, 1.25mL;

W: 样本干重, 5×10^{-3} 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

$$y = 5.25x - 0.0043; \quad x \text{ 为标准品浓度 (mg/mL), } y \text{ 为吸光值。}$$

2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{纤维素 (mg/g 干重)} &= [(\Delta A + 0.0043) \div 5.25 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \times 20 \\ &= 4.76 \times (\Delta A + 0.0043) \div W \end{aligned}$$

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 5×10^{-3} g;

20: 样本稀释倍数。

注意事项：

最低检测限为 1mg/g 干重或 10ng/ mg prot