

使用说明书

Instruction Manual

纤维素含量检测试剂盒（微量法）

Cellulose Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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，再与蒽酮脱水缩合，生成糠醛衍生物，颜色的深浅可间接定量测定纤维素含量。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0046M-A	100mL×1 瓶	4℃保存
CB0046M-B	粉剂×2 瓶	4℃避光保存
CB0046M-C	5mL×1 支	4℃保存
CB0046M-Standard	粉剂×1 支	4℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、80%乙醇、丙酮、浓硫酸（不允许快递）和蒸馏水等。

二、样本处理：

- 细胞壁的提取：取约 0.3g（标记为 W1）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 CB0046M-A（去除淀粉）浸泡 15 小时，6000g 25℃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℃离心 10min，弃上清即可），然后将沉淀干燥（60-100℃），称重得细胞壁物质（CWM），标记为 W2。
- 纤维素的提取：称取烘干的 CWM 约 5mg（标记为 W3），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。

三、测定步骤：

- 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 620nm，蒸馏水调零。
- 调节水浴锅至 95 度。

3. 将 CB0046M-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 CB0046M-B 中加入 2.5mL CB0046M-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，吸取 200μL 于 96 孔板中或微量玻璃比色皿中测定 620nm 处吸光值 A，分别为 A 测定管，A 标准管，A 空白管；计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

注：空白管和标准曲线只需做 1-2 次。

四、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）。

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

$$\text{纤维素 (mg/g 干重)} = x \times V_{\text{提取}} \times 20 \div W3 \div 1.11 = 22.52 x \div W3$$

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 100μg 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. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

