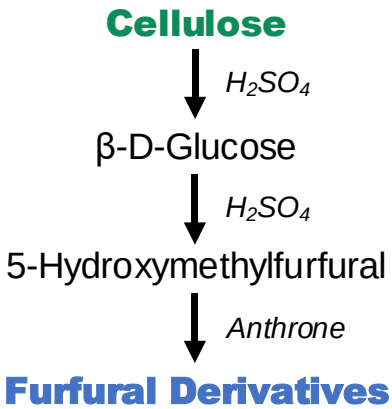
纤维素（CLL）含量检测试剂盒

Cellulose (CLL) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Catalog Number **AKSU007C**
Storage Temperature **2-8°C**
Size **70T/50S**

Visible Spectrophotometry

纤维素（CLL）含量检测试剂盒

Cellulose (CLL) Content Assay Kit

一、产品描述

纤维素是自然界中分布最广、含量最多的一种大分子多糖，能够与半纤维素、果胶及木质素结合形成植物细胞壁的主要结构成分。纤维素在酸性条件下可水解为 β-D-葡萄糖，β-D-葡萄糖在强酸环境中脱水生成 5-羟甲基糠醛，进一步与蒽酮脱水缩合生成蓝绿色糠醛衍生物，产物在 620 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测纤维素的含量。

Boxbio-纤维素含量检测试剂盒中添加了多糖专用去除组分：前处理过程中添加专用复合酶高效去除高淀粉样本中的淀粉成分，避免其对纤维素含量检测的干扰，确保检测结果的准确可靠。

二、产品内容

名称		试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一		液体×1 瓶 （自备试剂）	4℃保存	**80%（v/v）乙醇** （160 mL 无水乙醇加入 40 mL 蒸馏水充分混匀）
试剂二	**组分 A**	粉剂×1 瓶	4℃保存	**使用前在组分 A 中加入 60 mL 组分 B 充分溶解** （配制后 4℃可保存 1 个月）
	组分 B	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三		液体×1 瓶 （自备试剂）	4℃保存	**按照蒸馏水：浓硫酸=2:3 的体积比配制** （充分混匀，冷却至室温后使用）
试剂四	**组分 A**	粉剂×2 瓶	4℃避光保存	**使用前每瓶组分 A 加入 3 mL 组分 B 充分溶解** 若较难溶解，可振荡或适当超声至完全溶解 （配制后 4℃可保存 1 周）
	组分 B	液体 8 mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品		粉剂×1 支	4℃保存	**使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解** （即为 10 mg/mL 葡萄糖标准液）
标准稀释液的制备（现用现配）：使用前将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 0.08、0.06、0.03、0.015、0.0075、0.00375 mg/mL 即为标准稀释液，配制方法详见注意事项②。				

自备试剂：无水乙醇（C_2H_6O，MW=46.07，CAS: 64-17-5）；丙酮（C_3H_6O，MW=58.08，CAS: 67-64-1）；浓硫酸（H_2SO_4，MW=98.078，CAS: 7664-93-9）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴、无水乙醇、浓硫酸和丙酮。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样品量及比例）

（1）细胞壁物质（CWM）的提取

①称取 0.1 g（记为 W1）样本，加入 **1 mL 试剂一**，室温研磨至匀浆（若样品质地坚硬，可先粉碎后再进行提取），90℃处理 20 min，冷却至室温，常温 10000 g 离心 10 min，弃上清液，**留沉淀**；

注：水浴加热过程中离心管盖有爆开的可能，建议使用胶带封口或使用带螺纹盖的离心管。

②沉淀使用 **1 mL 蒸馏水**清洗 1 遍（涡旋振荡 2 min，常温 10000 g 离心 10 min，弃上清液），然后加入 **1 mL 试剂二**充分混匀，60℃反应 30 min，常温 10000 g 离心 10 min，弃上清液，**留沉淀**；然后使用 **1 mL 蒸馏水**清洗 2 遍沉淀（涡旋振荡 2 min，常温 10000 g 离心 10 min，弃上清液）；

③沉淀分别使用 **1.5 mL 试剂一**和**丙酮**交替清洗 2 遍（涡旋振荡 2 min，常温 10000 g 离心 10 min，弃上清液），尽可能吸尽丙酮，确保沉淀中无明显残留，于 60℃烘干至恒重（参考时间 1-3 h），即为细胞壁物质（CWM），称重记为 W2。

（2）纤维素（CLL）的提取

称取细胞壁物质 5 mg（记为 W3）至离心管中，冰水浴中缓慢加入 **1 mL 试剂三**，充分振荡混匀，冰水浴静置 30 min，常温 10000 g 离心 10 min，取上清液，将上清液使用蒸馏水稀释 20 倍即为待测样本。（注：若细胞壁物质较为坚硬，可先研碎后再加入 1 mL 试剂三充分振荡混匀）

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 620 nm，蒸馏水调零。

②在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管（μL）	标准管（μL）	空白管（μL）
待测样本	300	-	-
标准稀释液	-	300	-
蒸馏水	-	-	300
试剂四	70	70	70
浓硫酸	630	630	630
95℃处理 10 min（密封以防止水分散失） 冷却至室温			

吸光值测定：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 620 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白；计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白，ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.08、0.06、0.03、0.015、0.0075、0.00375 mg/mL 为横坐标（x），以其对应的 ΔA 标准为纵坐标(y)，绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，将 ΔA 测定代入公式中得到 x(mg/mL)。

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

3.纤维素（CLL）含量计算

①按样本质量计算

$$纤维素含量（mg/g）= \frac{x\times V提\times 20\times W2}{W3\times W1\times 1.11} = \frac{18.02\times x\times W2}{W3\times W1}$$

②按样本细胞壁物质（CWM）质量计算

$$纤维素含量（mg/g）= \frac{x\times V提\times 20}{W3\times 1.11} = \frac{18.02\times x}{W3}$$

注释：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纤维素用蒽酮试剂所显示的颜色；V提：提取过程中加入试剂三的体积，1 mL；20：待测样本稀释倍数；W1：样本质量，g；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。

四、注意事项

①若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本适当稀释后再进行测定；低于最低值建议制备更高浓度的样本后再进行测定，计算时相应修改；

②**标准稀释液的制备（现用现配）：**使用前将 10 mg/mL 葡萄糖标准液使用蒸馏水稀释至 0.08、0.06、0.03、0.015、0.0075、0.00375 mg/mL 即为标准稀释液；

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度（mg/mL）	10	1.0	1.0	0.06	0.03	0.015	0.0075
标准液体积（μL）	100	80	60	500	500	500	500
蒸馏水体积（μL）	900	920	940	500	500	500	500
稀释后浓度（mg/mL）	1.0	0.08	0.06	0.03	0.015	0.0075	0.00375

③试剂四组分 B 挥发性强且具有刺激性气味，建议在通风橱中进行配制，注意做好防护；

④浓硫酸和试剂三具有强腐蚀性，操作全程需特别注意：纤维素提取过程中，为防止冰水混入离心管中产生实验误差，冰浴中的离心管需牢固固定（建议在冰水浴内预先放置管架，将离心管置于架中后再缓慢加入浓硫酸）；在加入试剂三和浓硫酸时，应缓慢滴加以避免液面沸腾烫伤或样本碳化；95℃水浴结束后，务必冷却至室温再打开离心管盖，以防液体飞溅烧伤；

⑤丙酮属于易燃、易挥发有机溶剂，严禁将含丙酮的沉淀放入高温烘箱（大于80℃）烘干；

⑥为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取2-3个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.