

纤维素 (CLL) 含量试剂盒说明书

(货号: G0715W 微板法 96 样)

一、产品简介:

纤维素是植物细胞壁的主要成分之一。纤维素含量的多少,关系到植物细胞组织发达程度,因而影响作物的抗倒伏、抗病虫害能力的强弱。

纤维素是由葡萄糖基组成的多糖,在酸性条件下加热使其水解成葡萄糖。然后在浓硫酸作用下,使单糖脱水生成糠醛类化合物。利用蒽酮试剂与糠醛类化合物反应生成蓝绿色物质。经光谱扫描该蓝绿色物质在620nm处有最大吸收峰,进而得到纤维素含量。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	临用前再缓慢加入 20mL 浓硫酸,混匀备用。
试剂二	粉剂×3 瓶	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,每瓶再缓慢加入 10mL 浓硫酸,不断搅拌,充分溶解,现配现用。
标准品	粉体×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、80%乙醇、丙酮、浓硫酸、研钵和蒸馏水。

四、纤维素 (CLL) 含量:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- ① 取适量组织样本烘干并磨碎,过 40 目筛备用;取 0.02g 过筛的粉末组织(若是鲜样可取 0.05g,水分充足样本可取 0.1g),加 1.5mL 的 80%乙醇,研磨匀浆,50℃水浴 20min(间隔 3min 晃动几下),取出流水冷却后,12000rpm,25℃10min,弃上清,留沉淀(尽量保留沉淀)。
- ② 向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇震荡混匀 2min,50℃水浴 20min(间隔 3min 晃动几下),取出流水冷却后,12000rpm,25℃10min,弃上清,留沉淀(尽量保留沉淀)。
- ③ 加入 1mL 的提取液(去淀粉),90℃水浴 15min(间隔 3min 晃动一次),12000rpm,室温(25℃)离心 10min,弃上清,留沉淀,向沉淀中加入 1mL 丙酮振荡混匀,12000rpm,室温(25℃)离心 10min,弃上清,留沉淀,(注:若色素仍很多,继续用丙酮提取 2-3 次),打开 EP 管置于 90℃孵育 20min,使沉淀干燥。
- ④ 在沉淀(若用组织研磨机研磨的样本,务必去掉钢珠等耗材,仅留待检测的样本沉淀)中加入 0.2mL 试剂一(注:尽量避免沉淀样本粘在管壁上,并密封管口),30℃水浴 1 小时后,倒入 10mL 离心管中,再用 5.6mL 蒸馏水分次涮洗 2mLEP 管并收集液体至上述 10mL 离心管中,混匀(或于振荡器上振荡使固体分散),密封管口;然后于 110℃孵育 1 小时,取出冷却,混匀后可取 1mL 混合液至 2mLEP 管中,于 8000rpm,室温离心 5min,取上清液待测。

2、上机检测:

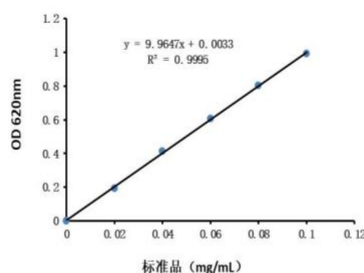
- ① 酶标仪预热 30min,设置温度在 25℃,设定波长到 620nm。
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释(如 20 倍,即 1 份上清液+19 份蒸馏水),确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	125	
蒸馏水		125
试剂二	250	250
混匀，沸水浴 (95℃) 水浴 5min (防止水份散失，可用封口膜缠紧)，冷却后取 200μL 至 96 孔板中，于 620nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

【注】若 A 测定值大于 1.5，可用蒸馏水进一步稀释样本 (即上清液)，稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 9.9647x + 0.0033，x 为标准品浓度 (mg/mL)，y 为 ΔA 。



2、纤维素含量(mg/g 重量)=[(ΔA -0.0033)÷9.9647×V1]÷(W×V1÷V)×0.9×D
=0.524×(ΔA -0.0033)÷W×D

纤维素含量(%)=[(ΔA -0.0033)÷9.9647×V1]÷(W×V1÷V)×0.9×D×10⁻³×100}%
=[0.524×(ΔA -0.0033)÷W×D] %

V---加入提取液体积，5.8mL；

V1---加入样本体积，0.125mL；

W---取样质量，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

0.9---葡萄糖缩合成纤维素的换算系数；

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液 (1mg/mL)：从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中，再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且-20℃保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。