

## 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：

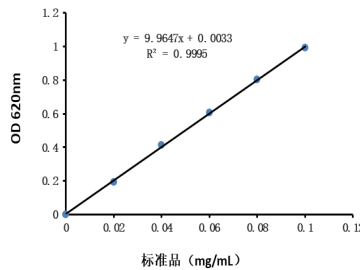
- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 620nm。
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释（如 20 倍，即 1 份上清液+19 份蒸馏水），确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

| 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°C) 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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

## 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  $\Delta A$ 。



2、纤维素含量(mg/g 重量)=[ $(\Delta A - 0.0033) \div 9.9647 \times V1$ ]  $\div$  [(W  $\times$  V1  $\div$  V)  $\times$  0.9  $\times$  D]

$$= 0.524 \times (\Delta A - 0.0033) \div W \times D$$

纤维素含量(%) = { [ $(\Delta A - 0.0033) \div 9.9647 \times V1$ ]  $\div$  [(W  $\times$  V1  $\div$  V)  $\times$  0.9  $\times$  D  $\times 10^{-3} \times 100$ ] } %

$$= [0.0524 \times (\Delta A - 0.0033) \div W \times D] \%$$

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°C 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。