

纤维素（CLL）含量试剂盒说明书

（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，密封管口；然后放入 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：

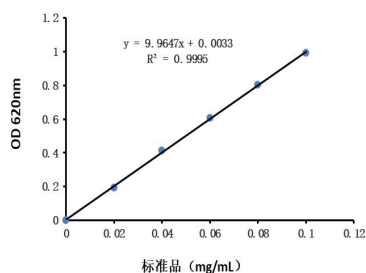
- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 620nm。
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释（如 20 倍，即 1 份上清液+19 份蒸馏水），确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

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

【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) = $[(\Delta A - 0.0033) \div 9.9647 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 0.9 \times D$
 $= 0.524 \times (\Delta A - 0.0033) \div W \times D$

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。