

## 纤维素（CLL）含量试剂盒说明书

（货号：BP10290F 分光法 48 样 有效期：6 个月）

### 一、指标介绍：

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：

| 试剂组分 | 试剂规格        | 存放温度   | 注意事项                                                                                     |
|------|-------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃避光保存 |                                                                                          |
| 试剂一  | 液体 5mL×1 瓶  | 4℃保存   | 1. 临用前再缓慢加入 10mL 浓硫酸，混匀备用；<br>2. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                          |
| 试剂二  | 粉剂 3 瓶      | 4℃避光保存 | 每瓶：<br>1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）；<br>2. 缓慢加入 10mL 浓硫酸，不断搅拌，充分溶解，现配现用；<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 标准品  | 粉剂 1 支      | 4℃保存   | 1. 若重新做标曲，则用到该试剂；<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制；<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                             |

### 三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、**80%乙醇、丙酮、浓硫酸**、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

### 四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

#### 1、样本提取：

①组织样本：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）。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）。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。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 液体样本：可直接测定，或者适当稀释后测定。若浑浊，离心后取上清检测。
- ③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000rpm，室温离心 5min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ $10^4$ ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

## 2、检测步骤：

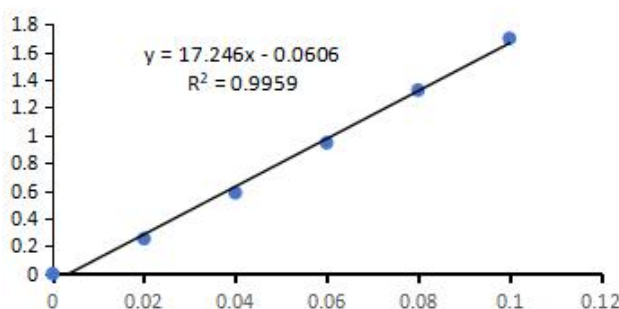
- ① 分光光度计预热 30min（等仪器过自检程序亦可），设定波长到 620nm，蒸馏水调零。
- ② 可取两个样本做适当梯度的稀释（如 20 倍，即 1 份上清液+19 份蒸馏水），确定适合本次实验的稀释倍数 D。
- ③ 在 EP 管中依次加入：

| 试剂（ $\mu$ L）                                                                                                              | 测定管 | 空白管（仅做一次） |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|
| 样本                                                                                                                        | 250 |           |
| 蒸馏水                                                                                                                       |     | 250       |
| 试剂二                                                                                                                       | 500 | 500       |
| 混匀，沸水浴（95℃）水浴 5min（防止水份散失，可用封口膜缠紧），冷却后全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，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： $y = 17.246x - 0.0606$ ，x 为标准品浓度（mg/mL），y 为  $\Delta A$ 。



### 2、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{纤维素含量(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0606) \div 17.246 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 0.9 \times D \\ &= 0.3026 \times (\Delta A + 0.0606) \div W \times D \\ \text{纤维素含量(\%)} &= \{[(\Delta A + 0.0606) \div 17.246 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times 0.9 \times D \times 10^{-3} \times 100\} \% \\ &= [0.0303 \times (\Delta A + 0.0606) \div W \times D] \% \end{aligned}$$

### 3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{纤维素含量(mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0606) \div 17.246 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ &= 0.3026 \times (\Delta A + 0.0606) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

### 4、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{纤维素含量(mg/mL)} &= [(\Delta A + 0.0606) \div 17.246 \times V1] \div V1 \times D \\ &= 0.3026 \times (\Delta A + 0.0606) \times D \end{aligned}$$

### 5、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{纤维素含量(mg/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0606) \div 17.246 \times V1] \div (V1 \div V \times 500) \times D$$

$$=0.3026 \times (\Delta A + 0.0606) \div 500 \times D$$

V---加入提取液体积，5.8mL；

V1---加入样本体积，0.25mL；

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；

500---细胞数量，万；

Cpr---上清液蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算；
- 2 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）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

| 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.1 mg/mL 的标品稀释液待用。 |     |      |      |      |      |     |
|-----------------------------------------------------|-----|------|------|------|------|-----|
| 标品浓度<br>mg/mL                                       | 0   | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| 标品稀释液<br>uL                                         | 0   | 40   | 80   | 120  | 160  | 200 |
| 蒸馏水 uL                                              | 200 | 160  | 120  | 80   | 40   | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                           |     |      |      |      |      |     |

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 EP 管中依次加入：

| 试剂 (μL)                                                                                                         | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                                              | 250 |              |
| 蒸馏水                                                                                                             |     | 250          |
| 试剂二                                                                                                             | 500 | 500          |
| 混匀，沸水浴（95℃）水浴 5min（防止水份散失，可用封口膜缠紧），冷却后全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 620nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。 |     |              |