纤维素（CLL）含量试剂盒说明书

（货号：ADS-W-TDX032-48　微板法 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； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂×2 瓶	4℃避光保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 缓慢加入 7.5mL 浓硫酸，不断搅拌，充分溶解，现配现用； 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； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 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）、96 孔板、离心管、酶标仪、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 酶标仪预热 30min（等仪器过自检程序亦可），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。

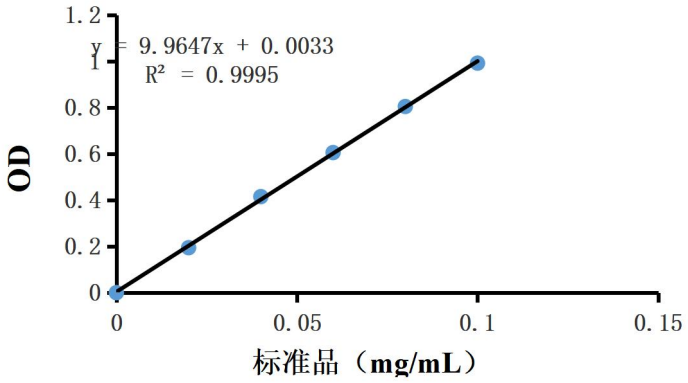
③ 在 EP 管中依次加入：

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，△A=A 测定管-A 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△A。



2、按照质量计算：

纤维素含量(mg/g)=[(△A-0.0033)÷9.9647×V1]÷(W×V1÷V)×0.9×D

=0.524×(△A-0.0033) ÷W×D

纤维素含量(%)={[(△A-0.0033)÷9.9647×V1]÷(W×V1÷V)×0.9×D×10^{-3}×100}%

=[0.0524×(△A-0.0033) ÷W×D] %

3、按蛋白浓度计算：

纤维素含量(mg/mg prot)=[(△A-0.0033)÷9.9647×V1]÷(Cpr×V1÷V)×D

=0.524×(△A-0.0033)÷Cpr×D

4、按照液体体积计算：

纤维素含量(mg/mL)=[(△A-0.0033)÷9.9647×V1]÷V1×D

=0.524×(△A-0.0033)×D

5、按细菌/细胞密度计算：

纤维素含量(mg/10^4 cell)=(△A-0.0033)÷9.9647×V1]÷(V1÷V×500)×D

=0.524×(△A-0.0033)÷500×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；

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 mg/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 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	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，△A=A 标准-A0 浓度。		