

木质素含量测定说明书

(微板法96样)

一、产品简介:

木质素是一种含有羟基和甲氧基的高分子芳香族化合物,是苯丙烷的衍生物,作为植物的化学成分与纤维素及半纤维素共同形成植物体骨架,大大提高了细胞壁的机械强度,为植物提供支持,适应环境,抗虫病害和抗倒伏的生理功能,同时,在木质素合成过程中产生的一些前体物质酚类和自由基可以破坏原菌相关酶类的生物活性与细胞膜的通透性,从而使植物有一定的自我防御能力。

本试剂盒采用乙酰化法,使木质素中的酚羟基发生乙酰化,其在280nm处有特征吸收峰,280nm的吸光值高低与木质素含量正相关。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体80mL×1瓶	4℃保存	该试剂具有强挥发性和一定的毒性,注意在通风橱操作并且每次用完需密封保存。
试剂二	液体40mL×1瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔UV板、低温离心机、水浴锅、移液器、蒸馏水、冰乙酸。

四、木质素含量的测定:

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10mg 过筛后的粉末组织至EP管中,加入1.5mL的80%乙醇,涡旋振荡混匀,于50℃条件下水浴20min(间隔3min晃动几下),取出后流水冷却至室温,在室温条件下于12000rpm离心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,于50℃条件下水浴20min(间隔3min晃动几下),取出后流水冷却至室温,在室温条件下于12000rpm离心10min,弃上清,留沉淀(尽量保留沉淀),95℃烘干沉淀,待用。

2、上机检测:

- ①酶标仪预热30 min,设置温度在25℃,设定波长到280nm。
- ②在上述样本制备步骤最后得到的EP管(95℃烘干的沉淀)(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)中依次加入:

试剂(μL)	测定管	空白管
	样本制备得到的沉淀	
试剂一 (沿管壁缓缓加入)	750	750
混匀,70℃水浴30min(管口用封口膜封紧或者用重物压实),结束后自然冷却至室温(注:务必冷却至室温后再去除封口膜或重物)。 (整个操作过程,谨慎操作,注意防护)		
试剂二 (沿管壁缓缓加入)	300	300

本试剂盒仅供科研使用

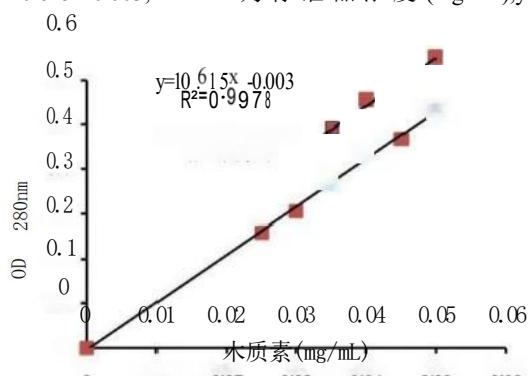
乙酸	450	450
振荡充分混匀，总体积为1.5mL(即为待检混合液)。		
注：由于冰乙酸易挥发，请混匀后立即测定！		
室温下5000rpm离心5min，取100 μ L澄清上清液于96孔UV板中， 再加400 μ L乙酸至96孔中，于280nm下读取吸光值A。分别记为A 空白管和A测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		
注：由于冰乙酸易挥发，可分小批测定(如每次测定5个样本)。		

【注】1. 若是木本植物也可考虑添加高氯酸进行乙酰化，即样本制备得到的沉淀+750 μL 试剂一+30 μL 高氯酸（也需缓慢加入，谨慎操作），充分混匀，70℃水浴30min（整个操作过程同上），加300 μL 试剂二和420 μL 乙酸，总体积仍为1.5mL，后续操作过程同上。

2. 若A 测定管大于1.8, 在最后一步用96孔UV 板检测时: 取20 μ L 澄清上清液+180 μ L 乙酸至96孔板中(空白管也一样操作), 则上清液相当于稀释了10倍, 则计算公式中的10替代2参与计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=10.615x-0.003$; x 为标准品浓度 (mg/mL), y 为 ΔA 。



2、按样本重量计算:

$$\text{木质素}(\text{mg/g 重量})=[(\triangle A+0.003)\div 10.615]\times V^1\div W\times 2$$

$$=0.1413\times(\triangle A+0.003)\div W\times 2$$

V1--- 定容后总体积, 1.5mL;

2---至96孔 UV 板中检测时上清液稀释倍数;