

木质素含量测定说明书

(货号: ADS-W-TR014 微板法 96 样)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 80mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 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; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	

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 (UV 板)、离心管、酶标仪、冰乙酸、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

冰乙酸。

四、指标测定:

1、样本提取:

- ① 取适量组织样本烘干并磨碎, 过 40 目筛备用; 取 2mg 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%乙醇振荡混匀 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、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30 min (等仪器过自检程序亦可), 设置温度在 25℃, 设定波长到 280nm。
- ② 在上述样本提取步骤最后得到的 EP 管 (95℃烘干的沉淀) 中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	空白管
	样本提取得到的沉淀	
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。 (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

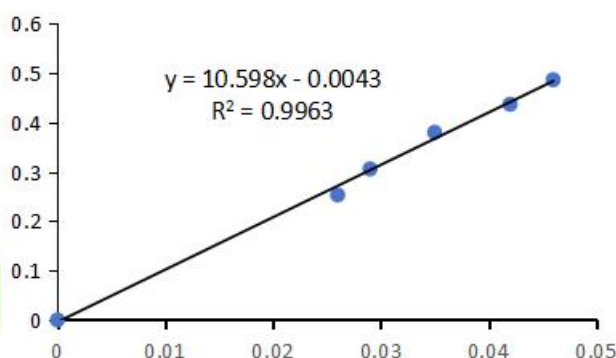
乙酸	450	450
振荡充分混匀，总体积为 1.5mL（即为待检混合液）。 注：由于冰乙酸易挥发，请混匀后立即测定！		
室温下 5000rpm 离心 5min，取 100μL 澄清上清液于 96 孔 UV 板中， 再加 100μL 乙酸至 96 孔中，于 280nm 下读取吸光值 A。分别记为 A 空白管和 A 测定管， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ 。 注：由于冰乙酸易挥发，可分小批测定（如每次测定 5 个样本）。		

【注】1.若是木本植物也可考虑添加高氯酸进行乙酰化，即样本提取得到的沉淀+750μL 试剂一+30μL 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 300μL 试剂二和 420μL 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 20μL 澄清上清液+180μL 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： $y = 10.598x - 0.0043$ ；x 为标准品浓度（mg/mL），y 为 ΔA 。



2、按样本重量计算：

$$\begin{aligned} \text{木质素(mg/g 重量)} &= [(\Delta A + 0.0043) \div 10.598] \times V1 \div W \times 2 \\ &= 0.1415 \times (\Delta A + 0.0043) \div W \times 2 \end{aligned}$$

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；

W---样本重量，2mg=2×10⁻³g。