

淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

淀粉是一种多糖，广泛存在于生物体中。测定淀粉的方法大致分为酸水解或酶法：酸水解方法仅适用于纯淀粉样品，因此应用有限。

本试剂盒提供一种酶法来检测样本中的淀粉含量，按照步骤使样本中的淀粉分离出来，再用仅水解淀粉的酶复合物使淀粉水解为葡萄糖，通过检测葡萄糖含量得到淀粉的含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 g×1 瓶	4℃ 保存	用前加 100mL 蒸馏水溶解，并用 50%的乙酸(1mL 蒸馏水+1mL 冰乙酸) 逐滴加入约 40μL， 务必核定 PH 为 6.4, (不能低于 6.4, 否则重新配置) 试剂一稀释液：30mL 试剂一+70mL 蒸馏水混匀
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 5.5mL 的试剂二溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 2.1mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 14mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 的试剂二溶解，即为 1mg/mL 葡萄糖。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、研钵、二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、乙酸、石油醚。

四、总淀粉含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① a. 干样处理：取 1-5g 样本烘干（50℃）至恒重，磨碎并过筛（60 目筛）得到待检均匀粉末样本；取 10mg 粉末样本，至 2mLEP 管中；**除脂**：向 EP 管中加入 0.5mL 的石油醚，研磨匀浆，50℃振荡 30min（也可间隔 3min 上下晃动几下），12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（**若样本含脂量少，此步可省去**）；**除糖**：接着向沉淀中加入 1mL 80%乙醇震荡混匀 2min，50℃水浴 20min（间隔 3min 晃动几下），取出冷却后，12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（乙醇除糖这步再重复一次），（**若样本含糖量少，此步可省去**）。向最后得到的沉淀中加入 0.5mL 的 DMSO 并涡旋振荡使样本分散悬浮于液体中（勿沉积于管底或块状悬浮）。

b. 鲜样处理：称取 0.1g 鲜样于研钵中，**除脂**：加入 0.5mL 的石油醚，研磨匀浆，转移至 2mLEP 管中并定容至 1mL，50℃振荡 30min（也可间隔 3min 上下晃动几下），12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（**若样本含脂量少，此步可省去**）；**除糖**：向沉淀中接着加入 1mL 80%乙醇震荡混匀 2min，50℃水浴 20min，取出冷却后，12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（乙醇除糖这步再重复一次），（**若样本含糖量少，此步可省去**）。向沉淀中加入 0.5mL 的 DMSO 并涡旋振荡使样本分散悬浮

于液体中（勿沉积于管底或块状悬浮）。

- ② 沸水浴直到样本呈分散溶解状态（约 2min，**确保没有凝胶块状**）；高速涡旋振荡后再沸水浴 15min（**间歇 2-3min 振荡一次，使样本全部分散溶解，若凝胶块仍存在，可增加沸水浴时间和振荡次数直到凝胶块完全溶解**）；
- ③ 样本取出置室温约 5min 使样本**冷却**后再加 1mL 无水乙醇**立即**高速涡旋振荡，**避免聚合（建议逐个样本操作）**，再加 0.5mL 无水乙醇来回颠倒 EP 管，静置 5min（有淀粉白色沉淀物产生），5000rpm 室温离心 5min，弃上清留沉淀（**使 EP 管轻轻倒置于吸水纸上约 5min 吸干剩余乙醇**）；
- ④ 向沉淀中加 1mLDMSO 涡旋振荡混匀，沸水浴 15min（**间歇 2-3min 振荡一次，使样本全部分散溶解，确保没有凝胶块，若凝胶块最终难完全溶解需弃掉重新制备**）。
- ⑤ 若是谷物样本，第④步得到的溶液中有杂质，需待自然冷却 5min 后于 3000rpm 室温（25℃，低于 10℃会结冻）离心 5min，上清液备用；若是纯淀粉样本，第④步得到的溶液呈澄清状，不需离心自然冷却 5min 备用；取出 0.1mL 澄清备用液于新 2mL 的 EP 管中，再加 0.9mL **试剂一稀释液**即为待检测液，即**稀释 10 倍**（测定务必在 2 个小时内完成）。

备注：若样本自身淀粉含量较低，可降低稀释倍数，如稀释 2-5 倍。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。
- ② 总淀粉上清液制备：在 EP 管中依次加入：

试剂名称（ μL ）	总淀粉测定管
待检液	40
试剂二	300
试剂三	50
40℃温育 30min 后，混合液待测， 转第③步	

- ③ 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	总淀粉测定管	空白管 （仅做一次）	标准管 （仅做一次）
液体	60 μL 总淀粉上清液	60 μL 试剂二	40 μL 标准品+360 μL 试剂二（ 现配现用 ）， 取出 60 μL
试剂四	20	20	20
试剂五	140	140	140
混匀，40℃下，避光温育 20min，于 510nm 处读取吸光值 A。			

五、结果计算：

$$\text{总淀粉含量(mg/g 重量)} = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 总淀粉} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1 总淀粉} \div \text{V}) \times \text{D} \times 6.5 \times 0.9$$

$$= 9.75 \times (\text{A 总淀粉} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times 0.9$$

$$\text{总淀粉含量(\%)} = (\text{C 标准} \times \text{V2}) \times (\text{A 总淀粉} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (\text{W} \times \text{V1 总淀粉} \div \text{V}) \times \text{D} \times 6.5 \div 10 \times 0.9$$

$$= 0.975 \times (\text{A 总淀粉} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W} \times 0.9$$

V---待检液总体积，1 mL；

V1 总淀粉---待检液体积，0.04mL；

V2---显色反应中标品体积，0.06mL；

D---稀释 10 倍；

C 标准---0.1mg/mL 葡萄糖；

W---样本质量，g；

9.75---总淀粉的稀释倍数。