

支链淀粉含量试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介:

支链淀粉, 又称胶淀粉, 难溶于水, 分子相对较大, 一般由几千个葡萄糖残基组成。利用双波长比色法测定支链淀粉与碘形成的络合物, 进而得到样本中支链淀粉的含量。

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	液体 90mL×1 瓶	4°C 保存	使用前摇匀
试剂二	液体 1mL×1 支	4°C 保存	用前取出 0.8mL 试剂二至干净瓶中或 10mLEP 管中, 并加入 13.2mL 蒸馏水混合备用。
试剂三	液体 2mL×1 支	4°C 保存	使用前摇匀
标准品	液体 1mL×1 支	4°C 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

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、冰、乙醇、石油醚、蒸馏水。

四、支链淀粉含量测定:

1、样本提取:

- ① 样本烘干, 磨碎并过 100 目筛待测, 准确称取 0.01g 过筛样本至 2mL 的 EP 管中, 加入 1mL85%的乙醇, 充分混匀, 50°C水浴提取 30min (间隔 3min 晃动几下), 冷却后, 8000rpm, 25°C离心 10min, 弃上清 (尽量保留沉淀), 留沉淀,
- ② 向沉淀中加入 0.5mL 石油醚, 混匀并振荡 5min, 8000rpm, 25°C离心 10min, 弃上清 (尽量保留沉淀), 留沉淀, EP 管置于 95°C蒸发 10-20min, 使石油醚挥发完全。
- ③ 向上步沉淀中 (同时, 准备一个空白 EP 管即空白管), 加入 0.1mL 的 95%的乙醇分散样品后, 再加入 0.9mL 试剂一, 混匀 (使样本全部沉浸在液体中), 封口, 95°C煮沸 10min (中间摇晃 1-2 次);。
- ④ 煮沸后, 冷却至室温, 将 EP 管中全部液体转移至 10mLEP 管中 (用 1mL 蒸馏水冲洗 EP 管, 全部转至 10mLEP 管中, 重复三次), 再加蒸馏水准确定容至 10mL, 混匀, 静置 5min, 取澄清上清液作为待检测液。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上。
- ② 制备试剂二混合液。在 2mL 的 EP 管中依次加入:

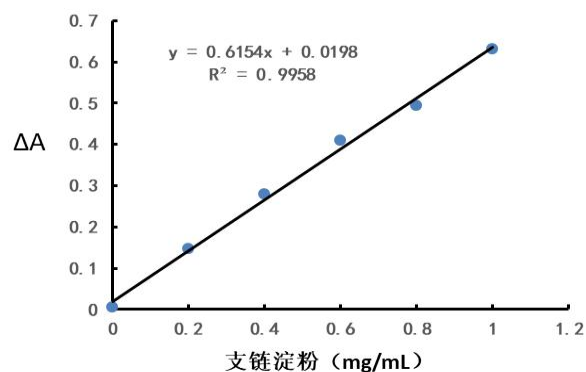
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本待检液	250	
空白管待检液		250
蒸馏水	630	630
试剂二	100	100
试剂三	20	20

务必混匀, 避光静置 10min 后, 取出 200μL 至 96 孔板中, 分别测定 540 和 740nm 处吸光值, A 测定=A540-A740, A 空白=A540-A740, $\Delta A = A \text{ 测定} - A \text{ 空白}$ 。

【注】加完试剂二, 混合液的 PH 于 3-5 之间, 若大于 5 则继续添加试剂二, 蒸馏水体积相应减少, 保持总体积 1mL 不变。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.6154x + 0.0198$ ； x 为标准品浓度（mg/mL）， y 为 ΔA 。



2、支链淀粉含量(mg/g 干重)=[$(\Delta A - 0.0198) \div 0.6154 \times V1$] $\div (W \times V1 \div V)$
 $= 16.25 \times (\Delta A - 0.0198) \div W$

V---样品提取液总体积，10mL；

V1---测定时所取样本的体积，0.25mL；

W---样本质量，g。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备试剂一稀释液：0.9mL 试剂一+9.1mL 的蒸馏水，总体积为 10mL。
 - 2 把标准品母液（1mg/mL 的支链淀粉标准品，若没有完全溶解可**超声**至完全溶解）：用试剂一稀释液稀释成六个浓度梯度的标准品：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
 - 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。
-