

直链/支链/总淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（分光法 48 样）

一、产品简介：

常用直链淀粉测定方法有电位测定法、旋光分析法或碘与直链淀粉结合力的比色法，然而这些方法存在不确定性。因为支链淀粉-碘复合物在此过程中同样会形成，导致直链淀粉含量的高估，因此需要修正。

本试剂盒利用伴刀豆球蛋白 A 只与支链淀粉结合而不与直链淀粉结合的特性，使其分离，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直链、支链和总淀粉的含量。

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 50mL×1 瓶	4°C保存	试剂一稀释液：30mL 试剂一+70mL 蒸馏水混匀。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 5.5mL 的试剂一稀释液溶解备用。
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 mg×1 瓶	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 5.5mL 的试剂三溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×瓶	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 8.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂六	液体 56mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	室温干燥保存	用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中，再加 2mL 试剂三充分溶解即得 1mg/mL 标准品，待用。(该标准品粉体开封后也需干燥保存和使用)
质控品	粉剂 mg×1 支	室温干燥保存	质控品为含 68%直链淀粉的淀粉物质，用于鉴定整个操作过程是否正确以及试剂是否正常。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、可调式移液器、研钵、二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、乙酸

四、直链/支链/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、待检测液制备：

- ① 取 1-5g 样本烘干（50°C）至恒重，磨碎并过筛（如 0.5mm 筛）得到待检均匀粉末样本；取 10mg 粉末样本或 10mg 的质控品至 2mL 的 EP 管中，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 1mL 的 DMSO 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, 若凝胶块最终难以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°C, 低于 10°C 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 (即稀释 10 倍); 稀释液即为待检测液。(该待检测液测定务必在 2 个小时内进行后面的实验)。

【注】: 若是淀粉含量较低如叶片、果实等, 可适当降低稀释倍数 (如由 10 倍降为 2 倍或不稀释)。

2、上清液制备

(1) 直链淀粉上清液制备: 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	直链淀粉测定管
待检液	200
试剂二	100
反复颠倒混匀 (不能涡旋) 几下, 静置 1 小时, 然后 14000rpm 室温 (25°C) 离心 10min, 取上清液 I 待测。	
以下步骤检测同第 (2) 步一起, 因都需温育 30min	
上清液 I	75
试剂三	175
95-100°C 煮沸 5min 后, 40°C 温育 5min, 观察: 有沉淀产生	
试剂四	50
混匀, 40°C 温育 30min 后, 8000rpm 室温离心 5min, 上清液待测, 转第 (4) 步	

(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
试剂三	300
试剂四	50
40°C 温育 30min 后, 得到混合液待测 (即总淀粉上清液), 转第 (4) 步	

3、上机检测:

(3) 可见分光光度计预热 30min 以上, 条件波长至 510nm, 蒸馏水调零。

(4) 显色反应, 在 1mL 玻璃比色皿中或 EP 管中 (反应结束后再转移全部液体至 1mL 玻璃比色皿中) 依次加入:

试剂名称 (μL)	直链淀粉 测定管	总淀粉 测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
液体	160 μL 直链淀粉上清液	160 μL 总淀粉上清液	160 μL 试剂三	16 μL 标准品 +144 μL 试剂三
试剂五	80	80	80	80
试剂六	560	560	560	560
混匀, 40°C下, 避光温育 20min, 于 510nm 处读取吸光值 A。				

五、结果计算:

1、按样本干重计算:

$$\text{直链淀粉含量(mg/g 干重)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \text{ 直链} \div V) \times D \times 7.5$$

$$= 6 \times (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

$$\text{总淀粉含量(mg/g 干重)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \text{ 总} \text{ 淀粉} \div V) \times D \times 2.4375$$

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

$$\text{直链淀粉含量(\%)} = (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \times 61.54$$

$$\text{支链淀粉(\%)} = 1 - \text{直链淀粉含量(\%)}$$

V---定容后待检液总体积, 1 mL;

V1 直链淀粉---待检液体积, 0.2mL;

V1 总淀粉---待检液体积, 0.04mL;

V2---显色反应中标品体积, 0.16mL;

D---稀释 10 倍;

C 标准---0.1mg/mL 葡萄糖

W---

样本质量, g;

6---直链淀粉的稀释倍数;

9.75---

总淀粉的稀释倍数;

61.54---6 除以 9.75。

六、注意事项:

- 1、质控品测出来的值应为 68%±2%，说明整个样本制备过程（待检液制备、上清液制备）及检测过程（即试剂盒试剂体系）都正确，否则重新操作。
- 2、质控品值不在 68%±2%之间，但标准管显色，说明试剂盒反应试剂无问题。
- 3、质控品测出值正常，但样本检测值有偏差，建议对检测步骤和样本制备过程进行核查。