



支链-直链-总淀粉含量试剂盒(酶法)

可见分光光度法

货号: R43942

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。

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℃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℃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℃保存	
试剂四	粉剂mg×1瓶	-20℃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℃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℃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。

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、二甲基亚砷(DMSO)、乙醇。



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℃)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℃, 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(即稀释10倍);稀释液即为待检测液。(该待检液测定务必在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℃)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℃煮沸5min后, 40℃温育5min, 观察: 有沉淀产生	
试剂四	50
混匀, 40℃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℃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	160μL直链淀粉上清液	160μL总淀粉上清液	160μL试剂三	16μL标准品+144μL试剂三
试剂五	80	80	80	80
试剂六	560	560	560	560
混匀, 40℃下, 避光温育20min, 于510nm处读取吸光值A。				

结果计算:

1、按样本干重计算:

直链淀粉含量(mg/g 干重)

$$=(C_{\text{标准}} \times V_2) \times (A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \text{ 直链} \div V) \times D \times 7.5$$



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

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

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

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

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

V---定容后待检液总体积, 1mL;

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。

注意事项:

- 1、质控品测出来的值应为 $68\% \pm 2\%$,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 $68\% \pm 2\%$ 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。