

支链淀粉含量试剂盒说明书

(货号: BP10269W 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 90mL×1 瓶	4℃保存	1. 使用前摇匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 13.2mL×1 瓶	4℃保存	1. 使用前加入 0.8mL 浓盐酸混合备用; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 2mL×1 支	4℃避光保存	1. 使用前摇匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体×1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

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、离心管、酶标仪、乙醇、石油醚、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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℃水浴提取 30min (间隔 3min 晃动几下), 冷却后, 8000rpm, 25℃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℃离心 10min, 弃上清 (尽量保留沉淀), 留沉淀, EP 管置于 95℃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, 晃匀 (使样本全部沉浸在液体中), 封口, 95℃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、检测步骤:

- 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:

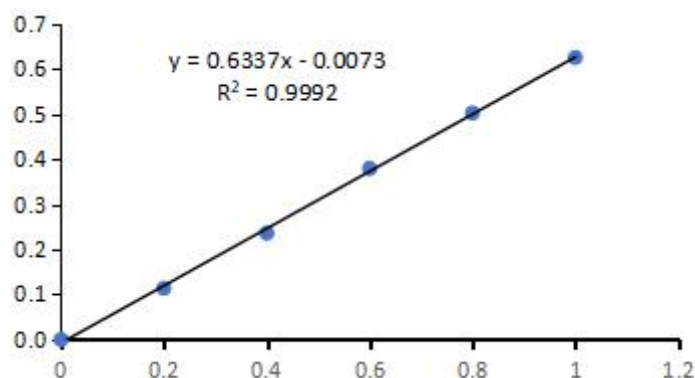
试剂 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本待检液	250	
空白管待检液		250

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： $y = 0.6337x - 0.0073$ ； x 为标准品浓度（mg/mL）， y 为 ΔA 。



2、按样本干重计算：

$$\begin{aligned} \text{支链淀粉含量(mg/g 干重)} &= [(\Delta A + 0.0073) \div 0.6337 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \\ &= 15.78 \times (\Delta A + 0.0073) \div W \end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{支链淀粉含量(mg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0073) \div 0.6337 \times V1] \div (Cpr \times V1 \div V) \\ &= 15.78 \times (\Delta A + 0.0073) \div Cpr \end{aligned}$$

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 向标准品 EP 管里面加入 0.09mL 的试剂一溶解（可 90 度加热溶解），再加 0.91mL 蒸馏水定容至 1mL，作为标准品母液，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用试剂一稀释液（制备试剂一稀释液：0.9mL 试剂一+9.1mL 的蒸馏水，总体积为 10mL）稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0，0.2，0.4，0.6，0.8，1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	80	160	240	320	400

水 uL	400	320	240	160	80	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	250	
蒸馏水	630	880
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， $A_{\text{测定}} = A_{540} - A_{740}$ ， $A_0 \text{ 浓度管} = A_{540} - A_{740}$ ， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_0 \text{ 浓度管}$ 。		