

直链/支链/总淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（货号：BP10269F-48 分光法 48 样 有效期：6 个月）

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℃避光保存	1. 试剂一稀释液 ：30mL 试剂一+70mL 蒸馏水混匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5.5mL 的试剂一稀释液溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 50mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	液体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 再加 5.5mL 的试剂三溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 8.2mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	液体 56mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	室温干燥保存	1. 用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中； 2. 加入 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 ）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
质控品	粉剂 1 支	室温干燥保存	1. 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：

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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、乙酸、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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**。（该待检测测定务必在 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) 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。				

五、结果计算：

1、按样本干重计算：

直链淀粉含量(mg/g 干重)=(C 标准×V2)×(A 直链淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(W×V1 直链
÷V)×D×7.5

=6×(A 直链淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷W

总淀粉含量(mg/g 干重)=(C 标准×V2)×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(W×V1 总淀粉
÷V)×D×2.4375

=9.75×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷W

直链淀粉含量(%)=(A 直链淀粉-A 空白)÷(A 总淀粉-A 空白)×61.54

支链淀粉(%)=1-直链淀粉含量(%)

2、按蛋白浓度计算：

直链淀粉含量(mg/mg prot)=(C 标准×V2)×(A 直链淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(Cpr×V1 直链
÷V)×D×7.5

=6×(A 直链淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷Cpr

总淀粉含量(mg/mg prot)=(C 标准×V2)×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(Cpr×V1 总淀粉
÷V)×D×2.4375

=9.75×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷Cpr

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；

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL)；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

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。