

直链/支链/总淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（货号：BP10269W-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×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 10.5mL 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 120mL×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. 加入 11mL 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 4.2mL 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 28mL×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、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、二甲基亚砷（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°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:

试剂组分 (μL)	直链淀粉测定管
待检液	200
试剂二	100
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, 冷却至室温, 观察: 会有少量沉淀产生。	
试剂四	50
混匀, 40°C 温育 30min 后, 8000rpm 室温离心 5min, 得到直链淀粉上清液待测, 转第 (4) 步	

(2) 总淀粉上清液制备: 在 EP 管中依次加入:

试剂组分 (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、检测步骤：

(3) 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。

(4) 显色反应，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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	60μL 直链淀粉上清液	60μL 总淀粉上清液	60μL 试剂三	40μL 标准品+360μL 试剂三（现配现用）， 取出 60μL
试剂五	20	20	20	20
试剂六	140	140	140	140
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：

$$\text{直链淀粉含量(mg/g 干重)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \text{ 直链} \div V) \times D \times 20 \\ = 6 \times (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

$$\text{总淀粉含量(mg/g 干重)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V1 \text{ 总淀粉} \div V) \times D \times 6.5 \\ = 9.75 \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

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

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

2、按蛋白浓度计算：

$$\text{直链淀粉含量(mg/mg prot)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (Cpr \times V1 \text{ 直链} \div V) \times D \times 20 \\ = 6 \times (A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr$$

$$\text{总淀粉含量(mg/mg prot)} = (C \text{ 标准} \times V2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (Cpr \times V1 \text{ 总淀粉} \div V) \times D \times 6.5 \\ = 9.75 \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div Cpr$$

V---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，0.06mL；

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%，说明整个样本提取过程（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提取过程进行核查。