

淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（货号:BP10267F-48 分光法 48 样 有效期：6 个月）

一、产品简介：

淀粉是一种多糖，广泛存在于生物体中。测定淀粉的方法大致分为酸水解或酶法：酸水解方法仅适用于纯淀粉样品，因此应用有限。

本试剂盒提供一种酶法来检测样本中的淀粉含量，按照步骤使样本中的淀粉分离出来，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	液体 20mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	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 3mL 的试剂二溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	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. 4.2mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 30mL×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 试剂二充分溶解即得 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。

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、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）、二甲基亚砜（DMSO）、乙醇、石油醚。

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、样本制备：

- ① a. 干样处理：取 1-5g 样本烘干（50℃）至恒重，磨碎并过筛（60 目筛）得到待检均匀粉末样本；取 10mg 粉末样本，至 2mLEP 管中；**除脂**：向 EP 管中加入 0.5mL 的石油醚，研磨匀浆，50℃振荡 30min（也可间隔 3min 上下晃动几下），12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（**若样本含脂量少，此步可省去**）；**除糖**：接着向沉淀中加入 1mL 80%乙醇震荡混匀 2min，50℃水浴 20min（间隔 3min 晃动几下），取出冷却后，12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（乙醇除糖这步再重复一次），（**若样本含糖量少，此步可省去**）。向最后得到的沉淀中加入 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）。

b. 鲜样处理：称取 0.1g 鲜样于研钵中，除脂：加入 0.5mL 的石油醚，研磨匀浆，转移至 2mLEP 管中并定容至 1mL，50℃振荡 30min（也可间隔 3min 上下晃动几下），12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（若样本含脂量少，此步可省去）；除糖：向沉淀中接着加入 1mL 80%乙醇震荡混匀 2min，50℃水浴 20min，取出冷却后，12000rpm，室温（25℃）离心 5min，弃上清，留沉淀（尽量保留沉淀）（乙醇除糖这步再重复一次），（若样本含糖量少，此步可省去）。向沉淀中加入 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 1mLDMSO 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 试剂一稀释液即为待检测液，即稀释 10 倍（该待检测液测定务必在 2 个小时内进行后面的实验）。

备注：若样本自身淀粉含量较低，可降低稀释倍数，如稀释 2-5 倍。

2、上机检测：

- ① 分光光度计预热 30min 以上，条件波长至 510nm，蒸馏水调零。
- 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
试剂二	300
试剂三	50
40℃温育 30min 后，混合液待测，转第③步	

- ③ 显色反应，在 1mL 玻璃比色皿中或在 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)	总淀粉测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
液体	160μL 总淀粉上清液	160μL 试剂二	16μL 标准品 +144μL 试剂二
试剂四	80	80	80
试剂五	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、按样本质量计算：

$$\begin{aligned}
 \text{总淀粉含量(mg/g 重量)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \\
 &\quad \times D \times 2.4375 \times 0.9 \\
 &= 9.75 \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times 0.9 \\
 \text{总淀粉含量(\%)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \text{ 总} \\
 &\quad \text{淀粉} \div V) \times D \times 2.4375 \div 10 \times 0.9
 \end{aligned}$$

$$=0.975 \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times 0.9$$

2、按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{总淀粉含量 (mg/mg prot)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (C_{\text{pr}} \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \\ &\quad \times D \times 2.4375 \times 0.9 \\ &= 9.75 \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times 0.9 \end{aligned}$$

V---定容后待检液总体积，1 mL；

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； 9.75---总淀粉的稀释倍数；

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。