

直链/支链/总淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉体 g×1 瓶	4℃ 保存	用前加 100mL 蒸馏水溶解，并用 50%的乙酸(1mL 蒸馏水+1mL 冰乙酸) 逐滴加入约 40μL， 务必核定 PH 为 6.4，(不能低于 6.4，否则重新配置) 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 10.5mL 的 试剂一稀释液 溶解备用。
试剂三	液体 120mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部， 再加 11mL 的试剂三溶解备用。
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部， 再加 4.2mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂六	液体 28mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部，再加 2mL 的试剂三溶解，即为 1mg/mL 葡萄糖。
质控品	粉剂 mg×1 支	室温	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：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、可调式移液器、研钵、二甲基亚砷（DMSO）、乙醇、乙酸。

四、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。（该待检测液测定务必在 2 个小时内完成后面的实验）。

【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
混匀（不能涡旋）几下，静置 1 小时(会有明显沉淀产生)，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，冷却至室温，观察：会有少量沉淀产生。	
试剂四	50
混匀，40℃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) 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	60 μL 直链淀粉上清液	60 μL 总淀粉上清液	60 μL 试剂三	40 μL 标准品+360 μL 试剂三 (现配现用), 取出 60 μL
试剂五	20	20	20	20
试剂六	140	140	140	140
混匀, 40 $^{\circ}\text{C}$ 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:

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

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

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

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

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

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

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;

六、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。