

直链/支链/总淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（货号：BN72704 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	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	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 瓶	-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	粉体 mg×1 支	室温干燥 保存	用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中， 再加 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)
质控品	粉剂 mg×1 支	室温干燥 保存	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。

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
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，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	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：

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×20

=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×6.5

=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(%)

V---待检液总体积，1 mL；

V1 总淀粉---待检液体积，0.04mL；

D---稀释 10 倍；

W---样本质量，g；

9.75---总淀粉的稀释倍数；

V1 直链淀粉---待检液体积，0.2mL；

V2---显色反应中标品体积，0.06mL；

C 标准---0.1mg/mL 葡萄糖；

6---直链淀粉的稀释倍数；

61.54---6 除以 9.75；

六、注意事项：

1、质控品测出来的值应为 68%±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。