

支链/直链/总淀粉含量（酶法）-分光法 50T

产品简介：

谷物淀粉中的直链淀粉最常见的测定方法是对直链淀粉的碘结合能力进行电位法、电流法或比色法测量，从而形成直链淀粉-碘包合复合物。然而，这些方法存在不确定性。支链淀粉-碘复合物也会形成，它们会降低通过非比色法测量的游离碘的浓度，并且可能会在与比色法中的直链淀粉-碘复合物相似的波长处吸收。

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。

保存条件：

未配制前在规定存储条件下 6 个月内有效，配制使用后在规定存储条件下 3 个月内有效。（各组分详细储存条件见瓶身）

试剂盒组成与配制：

试剂名称	储存条件	KB056-50T	配制过程
试剂一	-20℃	粉剂 mg×1 瓶	用前甩几下试剂落入底部，再加 25ml 的 ConA 溶剂将其溶解备用，用前可分为适当大小的小份，并在使用之间储存在-10℃以下的聚丙烯管中，如有可能，在使用过程中保持冷却。（未配制时在-20℃稳定 2 年以上，配制使用后在-20℃稳定 1~3 个月）
试剂二	-20℃	粉剂 mg×1 瓶	用前甩几下试剂落入底部，再将瓶中内容物溶解在 10 ml 乙酸钠缓冲液（100 mM, pH 4.5）中。分为适当大小的等分试样，并在使用期间储存在-10℃以下的聚丙烯管中，如有可能，在使用过程中保持冷却，（未配制时在-20℃稳定 2 年以上，配制使用后在-20℃稳定 1~3 个月）
试剂三	4℃	粉剂 g×1 瓶	用之前加 450ml 蒸馏水溶解混匀，后用 2M 氢氧化钾调节至 pH7.4，最后用蒸馏水定容至 500ml，即为试剂三。
试剂四	-20℃	粉剂 mg×1 瓶	用 60ml 试剂三缓冲液溶解试剂四中的内容物，并将其定量转移到含有剩余试剂三缓冲液的瓶子中。用铝箔盖住这个瓶子，以保护密封的试剂不受光照。（未配制时在 2-5℃或 < -10℃下存放超过 12 个月，配制使用后在 2-5℃或 < -20℃可稳定 1~3 个月）

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

			备注：如果该试剂要以冷冻状态储存，则最好将其分装 为小份，在使用过程中仅冷冻/解冻一次。 新制备试剂，其颜色为浅黄色或浅粉色。在 2-3 个月后， 若该溶液将呈现出更强烈的粉红色应立即对照蒸馏水读 数，吸光度应小于 0.05，若大于此数值，则表示该溶液 不可再使用。
标准品	4℃	液体 5ml×1 瓶	D-葡萄糖标准溶液（5 ml， 1.0 mg/ml）

1. 所需的仪器和用品：

可见分光光度计、10mm 玻璃比色皿、水浴锅、可调式移液器、冰、 二甲基亚砜（DMSO,分析级）、乙醇、乙酸和蒸馏水

2. 需配试剂：

乙酸钠缓冲液（100 mM， pH 4.5）：

向 900 ml 蒸馏水中添加 5.9 ml 冰醋酸，通过添加 NaOH 溶液将 pH 值调节至 pH 4.5，加入 0.2g 叠氮化钠（防腐剂，若没有该试剂可不添加），调节体积至 1L。

浓缩 ConA 溶剂（600 mM， pH 6.4 醋酸钠缓冲液）：

称取 49.2 g 无水乙酸钠，175.5 g NaCl， 0.5g 二水合 CaCl_2 ， 0.7g 六水合 MgCl_2 和 0.7 g 四水合 MnCl_2 ，后加入 900ml 蒸馏水。逐滴加入冰醋酸，调节 pH 至 6.4（**不能低于 6.4，否则重新配置**），然后用蒸馏水将其定容至 1L。

ConA 溶剂（工作浓度）：取 30ml 浓缩 ConA 溶剂用蒸馏水将其定容（比例为 3：7）至 100ml，现用现配。

淀粉含量测定：

1. 准确称量淀粉或面粉样品 $20 \pm 0.2\text{mg}$ ，放入 10 ml 离心管中；
2. 向离心管中加入 1ml DMSO，同时在涡旋仪上低速轻轻搅拌；之后盖上管子，在 100°C 沸水浴中加热，直到样品完全分散（约 1min）；

注意：需确保没有凝胶状的淀粉块存在



3. 在涡旋仪上高速搅拌离心管中的内容物，并将离心管放入水浴锅中 100℃水浴 15min，期间使用涡旋仪混匀 3~5 次。

4. 加热结束后立即对样品进行涡旋并加入 2 ml 乙醇 (95%(v/v))，继续在涡旋仪上持续搅拌，混合均匀后再加入 4 ml 乙醇 (95%(v/v))，盖上管子并倒置使样品于液体充分混合 15min；

注意：倒置静置时管中会形成淀粉沉淀，为正常现象

5. 将离心管以 2,000xg 离心 5min，弃去上清液，倒置在纸巾上沥干 10min，确保所有的乙醇都已排空，将沉淀用于在随后的直链淀粉和总淀粉测定中。

6. 将含有淀粉样品沉淀的离心管放置在涡旋仪上轻轻涡旋同时加入 2ml DMSO 并立即涡旋混合，之后将离心管放入水浴锅中 100℃沸水浴 15min，并不时搅拌，防止出现凝胶状的块状物；

7. 将试管从沸水浴中取出后冷却至室温，加入 4ml ConA 溶剂，充分混合，然后将试管内容物定量转移（用 ConA 溶剂反复洗涤）到 25 ml 容量瓶中，并定容至 25ml，即为待测液。注：若是谷物样本，第 6 步得到的溶液中有杂质，需待自然冷却 5min 后于 3000rpm 室温（低于 10℃会冻结）离心 5min，上清液备用；若是纯淀粉样本，第 6 步得到的溶液呈澄清状，不需离心自然冷却即可。

注意：样品应在 2 小时内进行检测。

上机检测：

(1) .可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 510nm，空白检测管调零。

(2) .直链淀粉上清液制备，在 EP 管中依次加入：

试剂名称	直链淀粉测定管 (ml)
待测液	1ml
试剂一	0.5ml
反复颠倒混匀（不能涡旋）几下，静置 1 h，14000rpm 室温离心 10min，上清液待测	
上清液	1 ml
乙酸钠缓冲液（100 mM，pH 4.5）	3 ml
95-100℃煮沸 5min 后，40℃温育 5min，观察：有沉淀产生	
试剂二	0.1 ml
混匀，40℃水浴 30min 后，2000g 室温离心 5min，取上清液待测	

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

(3) .总淀粉上清液制备，在 EP 管中依次加入：

试剂名称	总淀粉测定管 (ml)
待测液	0.5 ml
乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5)	4 ml
试剂二	0.1 ml
40°C 水浴 30min 后待测	

(4) .显色反应：

试剂名称	直链淀粉测定管 (ml)	总淀粉测定管 (ml)	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样品	1 ml (直链淀粉上清液)	1 ml (总淀粉上清液)	1 ml (乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5))	0.1 ml (标准品)+0.9 ml (乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5))
显色 (三和四混合液)	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
混匀，40°C水浴避光 20min，于 510nm 处读取吸光值 A				

反应结束后将 3ml 液体转移至玻璃比色皿中，于 510nm 处读数；

结果计算

1、按样本干重计算

直链淀粉含量(mg/g 干重)：

$$\begin{aligned} \text{直链淀粉, mg/g (干重)} &= \frac{(A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \times C_{\text{标准}} \times 6.15 \times V \times \frac{168.14}{186.16} \div W \\ &= 13.89 \times \frac{(A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \div W \end{aligned}$$

总淀粉含量(mg/g 干重)：

$$\begin{aligned} \text{总淀粉, mg/g (干重)} &= \frac{(A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \times C_{\text{标准}} \times 9.2 \times V \times \frac{168.14}{186.16} \div W \\ &= 20.77 \times \frac{(A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \div W \end{aligned}$$



2、直链淀粉含量 (%) :

$$\begin{aligned}\text{直链淀粉, \% (w/w)} &= \frac{(A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白})}{(A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白})} \times \frac{6.15}{9.2} \times 100 \\ &= 66.8 \times \frac{(A \text{ 直链淀粉} - A \text{ 空白})}{(A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白})}\end{aligned}$$

支链淀粉含量 (%) :

$$\text{支链淀粉, \% (w/w)} = 100\% - \text{直链淀粉}\%$$

其中: V---定容后待检液总体积, 25ml;

C 标准---0.1mg/ml 葡萄糖 ;

W---样品称样量, g;

168.14---葡萄糖分子量减去水分子的分子量;

186.16---葡萄糖分子量;

6.15---直链淀粉的稀释倍数;

9.2---总淀粉的稀释倍数;

注意事项:

1、二甲亚砜作为皮肤刺激物, 因此应谨慎使用。它通过皮肤吸收, 会对皮肤和眼睛造成刺激。使用时穿戴防护品并避免溅出溶剂, 尽可能在通风柜中使用。

2、刀豆球蛋白 A 通过吸入、皮肤接触和摄入有害。影响可能是不可逆的并且可能涉及致畸作用。处理结晶 Con A 时穿戴适当的防护用品及佩戴手套。

