

Starch Content Kit

淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

货号: BN72192 | 方法: 微板法 | 规格: 96 样

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 100mL×1 瓶	4°C保存	试剂一稀释液: 30mL 试剂一+70mL 蒸馏水混匀
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 μ L×1 瓶	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 5.5mL 的试剂二溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 2.1mL 的蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 14mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	室温干燥保存	使用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中, 再加 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)

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、二甲基亚砜 (DMSO)、乙醇、石油醚。

四、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、样本制备:

- ① a. 干样处理: 取 1-5g 样本烘干 (50°C) 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°C 振荡 30min (也可间隔 3min 上下晃动几下), 12000rpm, 室温 (25°C) 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°C 水浴 20min (间隔 3min 晃动几下), 取出冷却后, 12000rpm, 室温 (25°C) 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°C 振荡 30min (也可间隔 3min 上下晃动几下), 12000rpm, 室温 (25°C) 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°C 水浴 20min, 取出冷却后, 12000rpm, 室温 (25°C) 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）**。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。

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 96 孔板中依次加入：

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	60μL 总淀粉上清液	60μL 试剂二	40μL 标准品+360μL 试剂二（ 现配现用 ），取出 60μL
试剂四	20	20	20
试剂五	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：

总淀粉含量(mg/g 重量)=(C 标准×V2)×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷(W×V1 总淀粉÷V)×D×6.5×0.9

= 9.75×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷W×0.9

总淀粉含量(%)=(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÷10×0.9

=0.975×(A 总淀粉-A 空白)÷(A 标准-A 空白)÷W×0.9

V---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，0.06mL；

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。