

Starch Content Kit

淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

货号:BN72193 | 方法: 可见分光法 | 规格: 48 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 50mL×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 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	液体 μL×1 支	-20°C保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 3mL 的试剂二溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×瓶	-20°C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。
试剂五	液体 30mL×1 瓶	4°C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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰、二甲基亚砜 (DMSO)、乙醇、石油醚和蒸馏水。

四、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 1mL 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 可见分光光度计预热 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：

$$\begin{aligned} \text{总淀粉含量(mg/g 重量)} &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \times D \times 2.4375 \times 0.9 \\ &= 9.75 \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times 0.9 \\ \text{总淀粉含量(\%)} &= (C \text{ 标准} \times V_2) \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div (W \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \times D \times 2.4375 \div 10 \times 0.9 \\ &= 0.975 \times (A \text{ 总淀粉} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W \times 0.9 \end{aligned}$$

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；