

淀粉含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-DF001 微板法 96 样 有效期: 9 个月)

一、指标介绍:

淀粉是一种多糖, 广泛存在于植物的根、茎、叶、种子、果实等组织中。

本产品采用酸水解法, 将淀粉分解为葡萄糖, 再用蒽酮比色法测定葡萄糖的含量, 即可换算淀粉含量, 测定波长为620nm。

二、试剂盒组分与配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 2 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

工作液配制: 临用前在一瓶试剂二中加入 3.75mL 蒸馏水后, 缓慢加入 11.25mL 浓硫酸, 不断搅拌, 充分溶解(可通过超声辅助加速溶解), 待用; 用不完的试剂 4℃保存一周。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)、浓盐酸、浓硫酸、乙醇。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

1.1 组织样本:

- ① 称取约 0.1g 组织样本(若是干样取 0.05g, 若是高淀粉干样取 0.01g 即可)于研钵中研碎, 加入 1mL 试剂一, 充分匀浆后转移到 EP 管中, 50℃水浴提取 30min(间隔 3min 晃动几下), 10000rpm, 25℃离心 5min, 弃上清, 留沉淀。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

- ② 沉淀中加入 0.5mL 蒸馏水, 放入 95℃水浴中糊化 15min(盖紧, 以防止水分散失)。
- ③ 冷却后, 加入 0.35mL 浓盐酸, 25℃常温提取 15min, 振荡 3-5 次。
- ④ 加入 0.85mL 蒸馏水, 混匀, 10000rpm, 25℃离心 10min, 取上清液待测。

1.2 液体样本:

- ① 取约 0.1mL 液体样本于 EP 管中, 加入 0.9mL 无水乙醇后来回颠倒 EP 管, 室温静置 5min, 10000rpm, 25℃离心 5min, 弃上清, 尽量留沉淀。再次向沉淀中加入 1mL 的 90%乙醇后振荡 5min(使沉淀分散开), 再室温静置 5min 后, 于 10000rpm, 25℃离心 5min, 弃上清, 留沉淀。

【注】: 若增加样本量, 可按照液体样本(mL): 无水乙醇(mL)为 1: 9 的比例进行。

- ② 沉淀中加入 0.5mL 蒸馏水, 放入 95℃水浴中糊化 15min(盖紧, 以防止水分散失)。
- ③ 冷却后, 加入 0.35mL 浓盐酸, 25℃常温提取 15min, 振荡 3-5 次。

④ 加入 0.85mL 蒸馏水，混匀，10000rpm，25℃离心 10min，取上清液待测。

2、检测步骤：

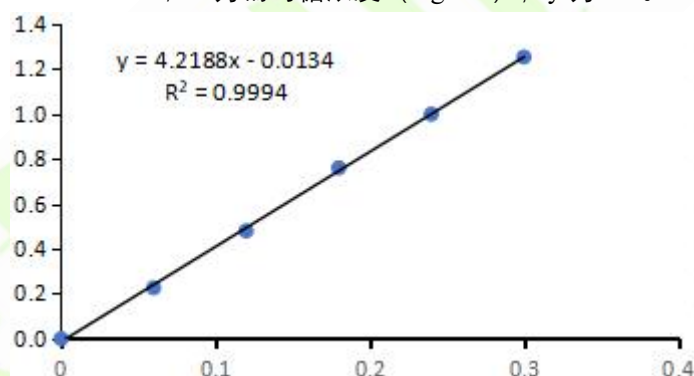
- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长 620nm。
- ② 先调选 2 个样本做预测定，确定本次样本的稀释(用蒸馏水)倍数 D（如 10 倍）。
- ③ 取 EP 管，按照加样表依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管(仅做一次)
样本	50	
蒸馏水		50
工作液	250	250
混匀，95℃水浴 10 min（盖紧，防止水分散失），自然冷却至室温，取 200μL 转移至 96 孔板中，在 620 nm 处读取各管吸光度值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】：1.若吸光值大于 1.5，请将粗提液即样本用提取液或蒸馏水稀释后再测定（严禁稀释加热反应后的混合液，否则会出现浑浊现象），计算公式中乘以相应的稀释倍数 D。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 4.2188x - 0.0134$ ；x 为葡萄糖浓度（mg/mL），y 为 ΔA 。



2、按样本鲜重计算：

$$\text{淀粉含量(mg/g 重量)} = (\Delta A + 0.0134) \div 4.2188 \times V_1 \div (W \times V_1 \div V) \times 0.9 \times D \\ = 0.3627 \times (\Delta A + 0.0134) \div W \times D$$

$$\text{淀粉含量(\%)} = [(\Delta A + 0.0134) \div 4.2188 \times V_1 \div (W \times V_1 \div V) \times 0.9 \times D] \times 10^{-3} \times 100 \\ = [0.3627 \times (\Delta A + 0.0134) \div W \times D] \%$$

3、按蛋白浓度计算：

$$\text{淀粉含量(mg/mg prot)} = (\Delta A + 0.0134) \div 4.2188 \times V_1 \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times 0.9 \times D \\ = 0.3627 \times (\Delta A + 0.0134) \div C_{pr} \times D$$

$$\text{淀粉含量(\%)} = [(\Delta A + 0.0134) \div 4.2188 \times V_1 \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times 0.9 \times D] \times 10^{-3} \times 100 \\ = [0.3627 \times (\Delta A + 0.0134) \div C_{pr} \times D] \%$$

4、按液体样本计算：

$$\text{淀粉含量(mg/mL)} = (\Delta A + 0.0134) \div 4.2188 \times V \div V_2 \times 0.9 \times D = 3.627 \times (\Delta A + 0.0134) \times D$$

V---加入提取液体积，1.7 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.05mL；

W---样本质量，g；

0.9---葡萄糖折算淀粉的系数；

V2---液体样本取样量, 0.1mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 从标准品管中称量取出 2mg 至一新 EP 管中, 再加 2mL 蒸馏水混匀溶解即 1mg/mL 的葡萄糖 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下:

吸取标准品母液 300uL, 加入 700uL 蒸馏水, 混匀得到 0.3mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加样表操作, 根据结果, 以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值, 过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
工作液	250	250
混匀, 95°C 水浴 10 min (盖紧, 防止水分散失), 自然冷却至室温, 取 200μL 转移至 96 孔板中, 在 620 nm 处读取各管吸光度值 A, $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		