

淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-DF001-96 微板法 96 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 试剂一稀释液：30mL 试剂一+70mL 蒸馏水混匀； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	液体 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5.5mL 的试剂二溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂 1 瓶	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 的蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 14mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	室温干燥保存	1. 用前准确称取 2mg 粉体即葡萄糖至一新 EP 管中； 2. 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）； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、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、样本提取：

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

注意事项: 若样本自身淀粉含量较低, 可降低稀释倍数, 如稀释 2-5 倍。

2、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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:

试剂组分 (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:

$$\begin{aligned}
 \text{总淀粉含量 (mg/g 重量)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \text{ 总淀粉} \div V) \\
 &\quad \times D \times 6.5 \times 0.9 \\
 &= 9.75 \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times 0.9 \\
 \text{总淀粉含量 (\%)} &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \text{ 总} \\
 &\quad \text{淀粉} \div V) \times D \times 6.5 \div 10 \times 0.9 \\
 &= 0.975 \times (A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times 0.9
 \end{aligned}$$

V---待检液总体积, 1 mL;

V2---显色反应中标品体积, 0.06mL;

C 标准---0.1mg/mL 葡萄糖;

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。

