

抗性淀粉和非抗性淀粉含量（酶法）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-DF009-24 微板法 24 样 有效期：6 个月）

一、指标介绍：

本试剂盒利用 α -胰淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶使非抗性淀粉水解成 D-葡萄糖，剩余的沉淀即为样品中的抗性淀粉，利用强碱溶液溶解抗性淀粉，再利用淀粉葡萄糖苷酶将其进一步水解成葡萄糖。通过检测葡萄糖含量得到非抗性淀粉和抗性淀粉的含量。

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 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 11mL 试剂一持续混匀 5min； 3. 再加 0.01mL 试剂七混匀，4000rpm 离心 10min，取上清保存备用； 4. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	自备	4℃ 保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 50%乙醇：22.5mL 无水乙醇加入 22.5mL 蒸馏水，混匀，备用。
试剂四	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	自备	4℃ 保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.1M 乙酸-乙酸钠 PH4.5（配制见附录）。
试剂六	液体 25mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
试剂七	液体 0.3mL×1 支	4℃ 避光保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂八	空管 1 支	4℃ 保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 临用前加入 0.025mL 试剂七和 1.35mL 试剂一，混匀备用； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂九	粉剂 1 支	-20℃ 避光保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 开盖前注意使粉剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂十	液体 12mL×1 瓶	4℃ 避光保存	
标准品	粉体 1 支	室温干燥保存	<ol style="list-style-type: none"> 1. 准确称取 2mg 标准品（葡萄糖）至一新 EP 管中； 2. 加入 1mL 试剂五充分溶解即得 2mg/mL 标准品； 3. 再用试剂五稀释 4 倍至 0.5mg/mL 备用。（该标准品粉体开封后也需干燥保存和使用）； 4. 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、乙醇、冰乙酸、乙酸钠、冰水浴和蒸馏水。

四、抗性和非抗性淀粉含量测定：

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：

抗性淀粉待测液制备：

- ① 取 1-5g 样本烘干（50℃）至恒重，磨碎并过筛（如 0.5mm 筛）得到待检均匀粉末样本，取 10mg 粉末至 2mLEP 管中，（若样本含糖，需先除糖：向沉淀中加入 1mL 的 80%乙醇，室温静置 30min(间隔 5min 振荡混匀一次)，5000rpm 室温离心 10min，弃上清留沉淀，室温条件下待乙醇挥发完（也可用吸水纸除干净乙醇）（整个除糖过程不能高温），再向 EP 管中加 0.4mL 试剂二，涡旋，水平放置于震荡培养箱中，37℃、200rpm 往复震荡培养 16 小时（下午 4 点至次日上午 8 点）。
- ② 取出加入 0.4mL 无水乙醇，涡旋震荡，5000rpm 室温离心 10min，收集上清至 10mL 管子里。向沉淀中加入 0.2mL 试剂三，涡旋，再加 0.6mL 试剂三，涡旋混匀，5000rpm 室温离心 10min，小心收集全部上清液至 10mL 管子里，重复操作一次。
- ③ 在冰浴条件下，向有沉淀的 EP 管中，一边用手震荡一边缓慢加入 0.2mL 试剂四，震荡直到完全溶解，冰浴或者放置 4℃冰箱 10min。取出加入 0.8mL 试剂六，颠倒混匀（不能涡旋），立即加入 10μL 试剂七混匀后，50℃孵育 30min(间歇混匀 5-6 次)。
- ④ 孵育完成后冷却至室温，对于 RS<10%的样本，直接 3000rpm 室温离心 5min；RS>10%的样本，用蒸馏水稀释 10 倍后再离心。

非抗性淀粉待测液制备：

抗性淀粉检测液制备操作步骤②中收集到的上清液，用试剂五定容至 10mL，即为非抗性淀粉待测液。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 510nm。
- ② 试剂八、九、十预先解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	抗性淀粉 测定管	非抗性淀粉 测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
	10μL 抗性淀粉上清液	10μL 非抗性淀粉上清液		10μL 0.5mg/mL 葡萄糖
试剂五	50		60	50
试剂八		50		
混匀，50℃下，避光温育 20min				
试剂九	20	20	20	20
试剂十	200	200	200	200
混匀，50℃下，避光温育 20min，于 510nm 处读取吸光值 A。				

五、结果计算：

1、按样本干重计算：

$$\begin{aligned} \text{抗性淀粉含量(mg/g 干重)} &= (C_{\text{标准}} \times V_3) \times (A_{\text{抗性淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \\ &\quad \div (W \times V_3 \div V_1) \times D \times 162 \div 180 \\ &= 0.505 \times (A_{\text{抗性淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \times 162 \div 180 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{非抗性淀粉含量(mg/g 干重)} &= (C_{\text{标准}} \times V_3) \times (A_{\text{非抗性淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \\ &\quad \div (W \times V_3 \div V_2) \times 162 \div 180 \end{aligned}$$

$$=5 \times (A_{\text{非抗性淀粉}} - A_{\text{空白}}) \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times 162 \div 180$$

V1---抗性淀粉待检液体积，1.01mL；

V2---非抗性淀粉待检液体积，10 mL；

V3---显色反应中上清液体积，0.01mL；

D---稀释倍数，未稀释即为1；

C 标准---0.5mg/mL 葡萄糖；

W---样本质量，g。

附录：0.1M 乙酸-乙酸钠 PH4.5 试剂配制：

A 母液（0.2mol/L 乙酸溶液）：量取 5.775mL 冰乙酸，稀释至 500mL。

B 母液（0.2mol/L 乙酸钠溶液）：称取 8.2g 无水乙酸钠（Mr=82.04）或者 13.61g 三水合乙酸钠（Mr=136.09）溶解，定容至 500mL。

取 A 母液 51.0mL，B 母液 49.0mL，混合，用 A 母液调节 PH 值至 4.5 后，用蒸馏水定容至 200mL。

（可根据实际需要量同比例缩小或扩增）