

支链+直链+总淀粉含量--微量法

产品简介:

谷物淀粉中的直链淀粉最常见的测定方法是对直链淀粉的碘结合能力进行电位法、电流法或比色法测量,从而形成直链淀粉-碘包含复合物。然而,这些方法存在不确定性。支链淀粉-碘复合物也会形成,它们会降低通过非比色法测量的游离碘的浓度,并且可能会在与比色法中的直链淀粉-碘复合物相似的波长处吸收。

本试剂盒利用伴刀豆球蛋白 A 只与支链淀粉结合而不与直链淀粉结合的特性,使其分离,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直链、支链和总淀粉的含量。

保存条件:

未配制前在规定存储条件下 6 个月内有效,配制使用后在规定存储条件下 3 个月内有效。(各组分详细储存条件见瓶身)

试剂盒组成与配置:

试剂名称	储存条件	KB062-100T/96S	配制过程
试剂一	-20℃	粉剂 mg×1 瓶 (ConA)	用前甩几下试剂落入底部,再加 25ml 的 ConA 溶剂将其溶解备用,用前可分为适当大小的小份,并在使用之间储存在-10℃以下的聚丙烯管中,如有可能,在使用过程中保持冷却。(未配制时在-20℃稳定 2 年以上,配制使用后在-20℃稳定 1~3 个月)
试剂二	-20℃	粉剂 mg×1 瓶	用前甩几下试剂落入底部,再将瓶中内容物溶解在 10 ml 乙酸钠缓冲液(100 mM, pH 4.5)中。分为适当大小的等分试样,并在使用期间储存在-10℃以下的聚丙烯管中,如有可能,在使用过程中保持冷却,(未配制时在-20℃稳定 2 年以上,配制使用后在-20℃稳定 1~3 个月)
试剂三	4℃	液体 500ml×1 瓶	
试剂四	-20℃	粉剂 mg×1 瓶	用 60ml 试剂三缓冲液溶解试剂四中的内容物,并将其定量转移到含有剩余试剂三缓冲液的瓶子中。用铝箔盖住这个瓶子,以保护密封的试剂不受光照。(未配制时在 2-5℃或 < -10℃下存放超过 12 个月,配制使用后在 2-5℃或 < -20℃可稳定 1~3 个月)
标准品	4℃	液体 5ml×1 瓶	D-葡萄糖标准溶液 (5 ml, 1.0 mg/ml)

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司,保留一切权利



1. 所需的仪器和用品:

酶标仪、196 孔板、水浴锅、可调式移液器、冰、二甲基亚砜 (DMSO,分析级)、乙醇、乙酸和蒸馏水

2. 需配试剂:

乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5) :

向 900 ml 蒸馏水中添加 5.9 ml 冰醋酸 (1.05 g/ml)。通过添加 1 M (4 g/100 ml) 氢氧化钠溶液 (需要大约 30 ml)，将 pH 值调节至 pH 4.5，加入 0.2g 叠氮化钠，调节体积至 1L，室温下稳定 2 年以上。

浓缩 ConA 溶剂 (600 mM, pH 6.4 醋酸钠缓冲液) :

称取 49.2 g 无水乙酸钠，175.5 g 氯化钠，0.5 g 二水合氯化钙，0.7 g 六水合氯化镁和 0.7 g 四水合氯化锰，后加入 900ml 蒸馏水。逐滴加入冰醋酸，调节 pH 至 6.4 (不能低于 6.4，否则重新配置)，然后用蒸馏水将其定容至 1L。(在 4°C 下稳定 2 周)

ConA 溶剂 (工作浓度) : 用蒸馏水将 30ml 浓缩 ConA 溶剂稀释至 100ml (比例为 3 : 7)，现用现配。

淀粉含量测定:

1.准确称量淀粉或面粉样品 10mg，放入 旋盖式样品管中。(注意：每个批次都包括一个参考样品，复制每五个测试样品)

2.向试管中加入 0.5ml DMSO，同时在涡旋混合器上以低速轻轻地搅拌，盖上管子，在沸水浴中加热，直到样品完全分散 (约 1 分钟)，确保没有凝胶状的淀粉块存在。

3.在涡旋混合器上高速搅拌密封管中的内容物，并将管子放入沸水中。涡流混合器，将试管置于沸水浴中，加热 15min，并用涡旋混合器间歇性高速搅拌。

4. 加热结束后立即加入 1 ml 乙醇 (95%(v/v))，在涡旋混合器上加入，防止结块，在涡旋混合器上持续搅拌。再加入 2 ml 乙醇 (95%(v/v))，盖上管子并倒置以混合，淀粉沉淀会形成，让试管静置 15min。(如果需要，可以过夜)

5. 将试管以 2,000g 离心 5 分钟，弃去上清液，在纸巾上沥干 10min，确保所有的乙醇都已排空，将颗粒用于在随后的直链淀粉和总淀粉测定中。

注意：每批样品中都包括一个参考样品，重复的每五份测试样品都要重复。

6. 将 1ml DMSO (轻轻涡旋混合) 加入淀粉颗粒中。将试管放在沸水浴中 15min，并不时搅拌，确保没有凝胶状的块状物。

7. 将试管从沸水浴中取出后，立即加入 2ml ConA 溶剂，充分混合，然后定量转移试管。将试管内容物定量转移 (用 ConA 溶剂反复洗涤) 到 25 ml 容量瓶中，并定容至 12.5ml，即为待测液。注：若是谷物样本，第 6 步得到的溶液中有杂质，需待自然冷却 5min 后于 3000rpm 室温 (25°C，低于 10°C 会结冻) 离心 5min，上清液备用；若是纯淀粉样本，第 6 步得到的 溶液呈澄清状，不需离心自然冷却 5min 备用 (此步骤对于检测结果是必要的) 注意：该溶液应在 2 小时内进行分析。

上机检测:

(1) .酶标仪预热 30min 以上，条件波长至 510nm，空白检测管调零。

(2) .直链淀粉上清液制备，在 EP 管中依次加入：



试剂名称	直链淀粉测定管 (ml)
待测液	1ml
试剂一	0.25ml
反复颠倒混匀 (不能涡旋) 几下, 静置 1 小时, 14000rpm 室温离心 10min, 上清液待测	
上清液	0.5 ml
乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5)	1.5 ml
95-100°C煮沸 5min 后, 40°C温育 5min, 观察: 有沉淀产生	
试剂二	0.05 ml
混匀, 40°C 水浴 30min 后, 2000g 室温离心 5min, 上清液待测	

(3) .总淀粉上清液制备, 在 EP 管中依次加入:

试剂名称	总淀粉测定管 (ml)
待测液	0.25 ml
乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5)	2 ml
试剂二	0.05 ml
40°C 水浴 30min 后待测	

(4) .显色反应:

试剂名称	直链淀粉测定管 (ml)	总淀粉测定管 (ml)	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样品	0.5ml (直链淀粉上清液)	0.5 ml (总淀粉上清液)	0.5 ml (乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5))	0.05 ml (标准品) +0.45 ml (乙酸钠缓冲液 (100 mM, pH 4.5))
显色 (三和四混合液)	2 ml	2ml	2 ml	2 ml
混匀, 40°C水浴避光 20min, 于 510nm 处读取吸光值 A				

反应结束后将 0.2ml 液体转移至 96 孔板中, 于 510nm 处读数;

计算:

$$\text{直链淀粉 \% (w/w)} = \frac{\text{吸光度 (直链淀粉)}}{\text{吸光度 (总淀粉)}} \times 6.15 \times 100$$

$$\begin{aligned} & \frac{\text{吸光度 (直链淀粉)}}{\text{吸光度 (总淀粉)}} \times 9.2 \times 1 \\ & = \frac{\text{吸光度 (直链淀粉)}}{\text{吸光度 (总淀粉)}} \times 66.8 \end{aligned}$$

其中 6.15 和 9.2 分别是直链淀粉和总淀粉提取物的稀释系数, 淀粉提取物的稀释系数。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



注意事项：

- 1、二甲亚砜作为皮肤刺激物，因此应谨慎使用。它通过皮肤吸收，会对皮肤和眼睛造成刺激。使用时穿戴防护品并避免溅出溶剂，尽可能在通风柜中使用。
2. 刀豆球蛋白 A 通过吸入、皮肤接触和摄入有害。影响可能是不可逆的并且可能涉及致畸作用。处理结晶 Con A 时穿戴适当的防护用品，处理含有 Con A 的溶液时佩戴手套。

