

支链+直链+总淀粉含量（微量法）

产品货号：BA2272

产品规格：100T

产品说明：

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。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	配制过程	保存条件
试剂一	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）	-20℃
试剂二	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10ml乙酸钠缓冲液（100mM，pH4.5）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）	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	用之前加450ml蒸馏水溶解混匀，后用2M氢氧化钾调节至pH7.4，最后用蒸馏水定容至500ml，即为试剂三。	2-8℃
试剂四	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）	-20℃
标准品	液体5ml×1瓶	D-葡萄糖标准溶液（5ml，1.0mg/ml）	2-8℃

自备材料：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、分析天平、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、浓硫酸（>98%，AR）、冰和蒸馏水。

测定步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 所需的仪器和用品

酶标仪、96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900ml蒸馏水中添加5.9ml冰醋酸（1.05g/ml）。通过添加1M（4g/100ml）NaOH溶液（需要大约30ml），将pH值调节至pH4.5，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（600mM，pH6.4醋酸钠缓冲液）：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

称取49.2g无水乙酸钠, 175.5g氯化钠, 0.5g二水合CaCl₂, 0.7g六水合MgCl₂和0.7g四水合MnCl₂, 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。

二、淀粉含量测定

1. 准确称量淀粉或面粉样品20±0.2mg, 放入10ml离心管中;
2. 向离心管中加入1ml DMSO, 同时在涡旋仪上低速轻轻搅拌; 之后盖上管子, 在100°C沸水浴中加热, 直到样品完全分散 (约1min);

注意: 需确保没有凝胶状的淀粉块存在

3. 在涡旋仪上高速搅拌离心管中的内容物, 并将离心管放入水浴锅中100°C水浴15min, 期间使用涡旋仪混匀3~5次。
4. 加热结束后立即对样品进行涡旋并加入2ml乙醇 (95% (v/v)), 继续在涡旋仪上持续搅拌, 混合均匀后再加入4ml乙醇 (95% (v/v)), 盖上管子并倒置使样品于液体充分混合15min;

注意: 倒置静置时管中会形成淀粉沉淀, 为正常现象

5. 将离心管以2000xg离心5min, 弃去上清液, 倒置在纸巾上沥干10min, 确保所有的乙醇都已排空, 将沉淀用于在随后的直链淀粉和总淀粉测定中。
6. 将含有淀粉样品沉淀的离心管放置在涡旋仪上轻轻涡旋同时加入2ml DMSO并立即涡旋混合, 之后将离心管放入水浴锅中100°C沸水浴15min, 并不时搅拌, 防止出现凝胶状的块状物;
7. 将试管从沸水浴中取出后冷却至室温, 加入4ml ConA溶剂, 充分混合, 然后将试管内容物定量转移 (用ConA溶剂反复洗涤) 到25ml容量瓶中, 并定容至25ml, 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 (低于10°C会冻结) 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, 不需离心自然冷却即可。

注意: 样品应在2小时内进行检测。

三、上机检测:

1. 可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至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	0.5ml
试剂一	0.25ml
反复颠倒混匀 (不能涡旋) 几下, 静置1h, 14000rpm室温离心10min, 上清液待测	
上清液	0.5ml
乙酸钠缓冲液 (100mM, pH4.5)	1.5ml
95-100°C煮沸5min后, 40°C温育5min, 观察: 有沉淀产生	
试剂二	0.05ml
混匀, 40°C水浴30min后, 2000g室温离心5min, 取上清液待测	

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	0.25ml
乙酸钠缓冲液 (100mM, pH 4.5)	2ml
试剂二	0.05ml
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)
------	--------------	-------------	------------	------------



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

样品	0.5ml (直链淀粉上清液)	0.5ml (总淀粉上清液)	0.5ml (乙酸钠缓冲液 (100mM, pH4.5))	0.05ml (标准品) +0.45ml (乙酸钠缓冲液 (100mM, pH4.5))
显色 (三和四混合液)	2ml	2ml	2ml	2ml
混匀, 40°C水浴避光20min, 于510nm处读取吸光值A				

5. 反应结束后将0.2ml液体转移至96孔板中, 于510nm处读数;

四、结果计算:

1. 按样本干重计算:

直链淀粉含量 (mg/g 干重):

$$\text{直链淀粉, mg/g (干重)} = \frac{(A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \times C_{\text{标准}} \times 6.15 \times V \times \frac{168.14}{186.16} \div W$$

$$= 13.89 \times \frac{(A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \div W$$

总淀粉含量 (mg/g 干重):

$$\text{总淀粉, mg/g (干重)} = \frac{(A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \times C_{\text{标准}} \times 9.2 \times V \times \frac{168.14}{186.16} \div W$$

$$= 20.77 \times \frac{(A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \div W$$

2. 直链淀粉含量 (%):

$$\text{直链淀粉, \% (w/w)} = \frac{(A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}})} \times \frac{6.15}{9.2} \times 100$$

$$= 66.8 \times \frac{(A_{\text{直链淀粉}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{总淀粉}} - A_{\text{空白}})}$$

支链淀粉含量 (%):

$$\text{支链淀粉, \% (w/w)} = 100\% - \text{直链淀粉}\%$$

其中: V-定容后待检液总体积, 25ml

C标准-0.1mg/ml葡萄糖

W-样品称样量, g

168.14-葡萄糖分子量减去水分子的分子量

186.16-葡萄糖分子量

6.15-直链淀粉的稀释倍数

9.2-总淀粉的稀释倍数

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。使用时穿戴防护用品并避免溅出溶剂, 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及佩戴手套。
3. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗, 食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com