

支链淀粉含量试剂盒说明书(精简版)

(货号: A152-2-1 比色法 50T/48 样)

一、测定原理:

利用 80%乙醇可以把样品中可溶性糖与淀粉分开,利用双波长比色法测定支链淀粉含量

二、自备仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 比色皿、乙醚(或石油醚)和蒸馏水。

三、试剂组成和配制:(试剂盒有效期 3 个月)

试剂一:液体 50mL×1 瓶;4℃保存;

试剂二:乙醚(或石油醚)(分析纯);(自备)

试剂三:液体 60mL×1 瓶;4℃保存;

试剂四:液体 5mL×1 瓶;4℃保存;

试剂五:液体 1mL×1 瓶;4℃避光保存。

试剂六:支链淀粉标准品 10mg×1 支;4℃保存。(配置方法见后面标准曲线制备)

四、样本前处理:

干样: 先于研钵中研碎(或液氮下研碎)成细粉状,然后称取 0.01~0.02g(建议称取约 0.01g)于 EP 管中,加入 1mL 试剂一,充分混匀约 30s,80℃水浴提取 30min,4000 转/分钟常温离心 5min,弃上清,留沉淀,加入 1mL 试剂二振荡混匀 5min,4000 转/分钟常温离心 5min,弃上清,留沉淀(吸到最后剩余的试剂二无法准确吸出,可以将 EP 管置于 37℃烘箱中烘 5-10 分钟后取出),加入 1mL 试剂三充分混匀,90℃水浴 10min 溶解,冷却后待测。

鲜样: 称取约 0.1g,加入 1mL 试剂一,封闭研磨匀浆,取出 80℃水浴提取 30min,4000 转/分钟常温离心 5min,弃上清,留沉淀,加入 1mL 试剂二振荡混匀 5min,4000 转/分钟常温离心 5min,弃上清,留沉淀(吸到最后剩余的试剂二无法准确吸出,可以将 EP 管置于 37℃烘箱中烘 5-10 分钟后取出),加入 1mL 试剂三充分混匀,90℃水浴 10min 溶解,冷却后待测。

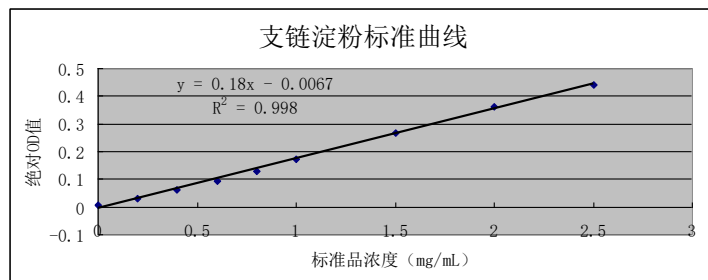
五、操作步骤:

	空白管	标准管	测定管
试剂三(μL)	100		
不同浓度标准液(μL)		100	
样本(μL)			100
试剂四(μL)	70	70	70
试剂五(μL)	10	10	10
蒸馏水(μL)	820	820	820
混匀,室温避光静置 10 分钟,1mL 比色皿,蒸馏水调零,分别测定 550nm 下和 743nm 下各管吸光度值。			

六、支链淀粉含量计算:

1、制作标准曲线:(下方数据供用户参考,实际值按用户自己制作的标曲数据为准)往 1 支标准品粉剂中加入 1mL 试剂三,漩涡混匀,待完全溶解即为 10mg/mL 标准应用液,并将 10mg/mL 标准液再用试剂三分别稀释成 0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.5、2、2.5mg/mL 几个浓度来制作标准曲线:(数据如下,光径 1cm,分光光度计)

作图如下(EXCEL 表制作):



2、按照样本质量计算:

$$\text{支链淀粉含量 (mg/g)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} + 0.0067}{0.18} \times V_{\text{提取液}} \div W$$

$V_{\text{提取液}}$: 前处理时制备成的提取液的总体积, 1mL;

W : 样本质量, g。

3、按照样本蛋白浓度计算:(不推荐)

$$\text{支链淀粉含量 (mg/g)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} + 0.0067}{0.18} \div \text{Cpr}$$

Cpr : 待测样本蛋白浓度, mg/mL。

七、测定意义:

支链淀粉是高度分支的多糖,淀粉中直链淀粉和支链淀粉的比例和含量对淀粉产品的加工、物化特性、糊化温度等有着直接的影响,对于不同比例直、支链淀粉的研究具有重要意义。

八、注意事项:

- 1、样本前处理中加试剂三前尽量让乙醚(或石油醚)蒸发干净,然后震荡混匀将沉淀分散开,以便于 90℃水浴后能充分溶解;
- 2、乙醚(或石油醚)吸取比较困难,可以选择玻璃移液器,有些微体积误差不影响实验;
- 3、标准品为支链淀粉纯品,加入试剂三后常温即可溶解,若溶解较慢,可适当加热以加速溶解,标准曲线只需做一次;
- 4、样本前处理好后,需要取 1-2 个相对差异较大的样本作预试,以确定样本最佳浓度(一般建议选择样本测定 OD 值在 0.2 左右的浓度来测定)。
- 5、支链淀粉显色为棕红色,样本测定时可能会有直链淀粉颜色干扰而看不到原本的颜色,但不影响吸光值测定。
- 6、如酶标仪有相应波长,也可以将最后的显色液吸取 200-300μL 进 96 孔板,在相应波长(550nm 和 743nm)下读取其吸光值,此时必须自己制作标准曲线用同样的方式读数。