（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

**产品货号：E-BC-K1201-M**

**产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)**

**检测仪器：酶标仪(检测波长 530 nm，参比波长 710 nm)**

# Elabscience®支链淀粉比色法测试盒

# Amylopectin Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本测试盒适用于检测植物组织中支链淀粉的含量。

## 检测原理

支链淀粉可以与显色成分结合在 530 nm 处有最大吸收，使用双波长法可以较为准确的测定支链淀粉的含量。

## 提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 (Size)(48 T) | 规格 (Size)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|---|---|---|---|---|
| 试剂一 (Reagent 1) | 提取液 A (Extracting Solution A) | 50 mL×1 瓶 | 50 mL×2 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 提取液 B (Extracting Solution B) | 50 mL×1 瓶 | 50 mL×2 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 糖化剂 (Saccharifying Reagent) | 55 mL×1 瓶 | 55 mL×2 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 显色剂 A (Chromogenic Agent A) | 1 mL×1 支 | 2 mL×1 瓶 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 显色剂 B (Chromogenic Agent B) | 1.2 mL×1 支 | 1.2 mL×2 支 | 2-8°C 避光 保存 6 个月 |
| 试剂六 (Reagent 6) | 标准品 （Standard） | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | 2-8°C 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 1 板 | | |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。对于粉剂，使用前请先离心，以免造成损失。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪（检测波长 530 nm，参比波长 710 nm），水浴锅，涡旋混匀仪

**试剂：**超纯水

## 试剂准备

① 试剂盒使用前，所有试剂平衡至25°C。

② 显色工作液的配制：

将试剂四：试剂五按体积比= 1：2配制，现配现用。

③ 10 mg/mL标准品的配制：

取一支试剂六，加入1000 μL试剂三，充分混匀，在90°C水浴10 min，冷却后充分混匀使用，未用完部分2-8°C保存2周。

④ 1 mg/mL标准品的配制：

取100 μL的10 mg/mL标准品，加入900 μL试剂三，充分混匀，未用完部分2-8°C保存3天。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **标准品浓度(mg/mL)** | **0** | **0.1** | **0.2** | **0.4** | **0.5** | **0.7** | **0.8** | **1.0** |
| **1 mg/mL 标准品(μL)** | 0 | 20 | 40 | 80 | 100 | 140 | 160 | 200 |
| **试剂三(μL)** | 200 | 180 | 160 | 120 | 100 | 60 | 40 | 0 |

## 样本准备

### ① 样本处理

将烘干样本(80°C 烘干至恒重，两次称量之差不超过 1 mg)充分研碎，称取 10 mg 样本，加入 1 mL 试剂一，常规匀浆，80°C 水浴 30 min，冷水冷却。5000 ×g，25°C 离心 5 min，弃上清，保留沉淀，加入 1 mL 试剂二，震荡混匀 5 min 。5000 ×g，25°C 离心 5 min，弃上清，保留沉淀，加入 1 mL 试剂三，充分混匀，90°C 水浴 10 min 进行糖化，冷水冷却后待测。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.012-1 mg/mL，参考下表进行稀释(仅供参考)：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|---|---|---|---|
| 土豆 | 2-8 | 稻米 | 2-8 |
| 玉米 | 2-8 | 食用淀粉（商品） | 2-8 |

注：稀释液为试剂三。

## 实验关键点

① 一次检测的样本数量控制在 20 个孔以内。

② 若观察到样本或标准品仍有沉淀，可以适当延长糖化时间(90°C 水浴时间)，以确保充分糖化，以免影响检测结果。

③ 实验过程中涉及到长时间高温水浴，可能造成体系体积损失，请确保容器密封良好。若有损失根据加热前加入的试剂，补充到 1 mL。

## 操作步骤

① 标准孔：取 50 μL 不同浓度标准品，加到对应的标准孔中。

测定孔：取 50 μL 待测样本，加到对应的测定孔中。

② 向①中标准孔、测定孔加入 30 μL 显色工作液。

③ 向②中标准孔、测定孔加入 170 μL 超纯水。

④ 振板混匀后，酶标仪于 530 nm 波长检测各孔 OD 值，记为 $A_1$。酶标仪于 710 nm 波长检测各孔 OD 值，记为 $A_2$，计算 $\Delta A=A_1-A_2$。

## 操作表

| | **标准孔** | **测定孔** |
|---|---|---|
| 不同浓度标准品（μL） | 50 | -- |
| 样本（μL） | -- | 50 |
| 显色工作液（μL） | 30 | 30 |
| 超纯水（μL） | 170 | 170 |
| 振板混匀后，酶标仪于 530 nm 波长检测各孔 OD 值，记为 $A_1$。酶标仪于 710 nm 波长检测各孔 OD 值，记为 $A_2$，计算 $\Delta A=A_1-A_2$。 | | |

## 结果计算

**标准品拟合曲线：y = ax+b**

**组织样本：**

$$\text{支链淀粉含量（mg/g）} = \left(\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白} - b\right) \div a \times V \times f \div m$$

**注解：**

y：标准品 ΔA -空白 ΔA (标准品浓度为 0 时的 ΔA)，$\Delta A = A_1 - A_2$

x：标准品的浓度

b：标准曲线的截距

a：标准曲线的斜率

$\Delta A_{测定}$：$\Delta A_{测定} = A_1 - A_2$

V：样本处理过程中加入试剂三的体积，单位 mL，建议取 1 mL

m：称取样本的质量，单位 g，建议取 0.01 g

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

# 附录1 关键数据

## 1. 技术参数

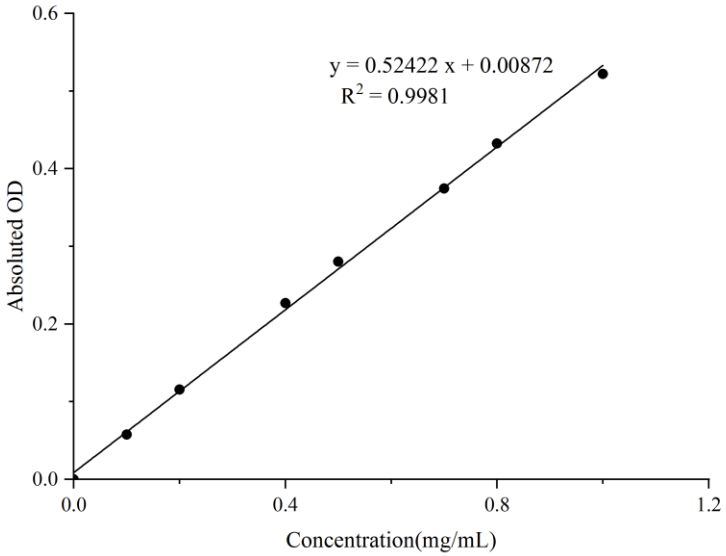
| | | | |
|---|---|---|---|
| **检测范围** | 0.012-1 mg/mL | **批间差** | 6.6-7.2% |
| **灵敏度** | 0.012 mg/mL | **批内差** | 1.8-3.6% |
| **加标回收率** | 101-104% | | |

## 2. 标准曲线（数据仅供参考）

① 不同浓度标准品加样量50 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

| **标准品浓度 (mg/mL)** | **0** | **0.1** | **0.2** | **0.4** | **0.5** | **0.7** | **0.8** | **1.0** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **$A_1$ 值** | 0.067 | 0.141 | 0.219 | 0.359 | 0.428 | 0.550 | 0.620 | 0.733 |
| | 0.069 | 0.142 | 0.217 | 0.363 | 0.429 | 0.550 | 0.631 | 0.744 |
| **平均 $A_1$ 值** | 0.068 | 0.142 | 0.218 | 0.361 | 0.429 | 0.550 | 0.626 | 0.739 |
| **$A_2$ 值** | 0.037 | 0.056 | 0.073 | 0.105 | 0.119 | 0.149 | 0.164 | 0.185 |
| | 0.041 | 0.054 | 0.074 | 0.105 | 0.119 | 0.144 | 0.164 | 0.190 |
| **平均 $A_2$ 值** | 0.039 | 0.055 | 0.074 | 0.105 | 0.119 | 0.147 | 0.164 | 0.188 |
| **平均 $A_1$ - $A_2$ 值** | 0.029 | 0.087 | 0.145 | 0.256 | 0.310 | 0.404 | 0.462 | 0.551 |
| **绝对 OD 值** | 0.000 | 0.058 | 0.116 | 0.227 | 0.281 | 0.375 | 0.433 | 0.522 |

② 绘制标曲 (如下图):


y = 0.52422 x + 0.00872
R2 = 0.9981
Absoluted OD
0.0
0.2
0.4
0.6
0.0
0.4
0.8
1.2
Concentration(mg/mL)

# 附录2 实例分析

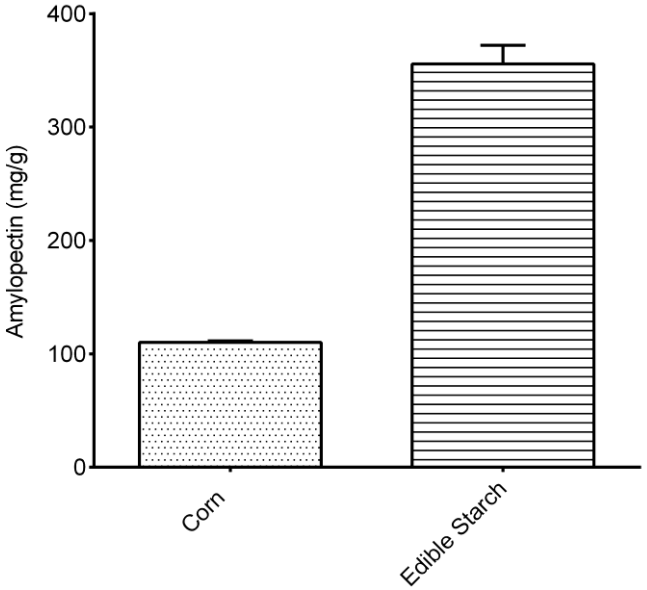
**例如检测玉米组织 (数据仅供参考):**

将烘干的玉米样本充分研碎，按说明书操作制备样本，用试剂三将待测样本稀释 8 倍后，取 50 μL 加入到酶标板孔中，按照操作表操作，结果如下：支链淀粉标准曲线：y = 0.52422x+0.00872，测定孔 $A_1$ 值为 0.423，$A_2$ 值为 0.313，空白孔 $A_1$ 值为 0.068，$A_2$ 值为 0.039，计算结果为：

$$\text{支链淀粉含量（mg/g）} = (0.423-0.313-(0.068-0.039)-0.00872) \div 0.52422 \times 1 \times 8 \div 0.01$$

$$= 110.30 \text{ mg/g}$$

按照说明书操作，测定玉米组织（稀释8倍，加样量50 μL），商品化食用淀粉（稀释4倍，加样量50 μL）中支链淀粉含量（如下图）：



# 附录3 问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 建议解决方案 |
| --- | --- | --- |
| 样本的OD值过低或检测不出 | 稀释倍数过高 | 降低稀释倍数 |
| | 样本浓度过低 | 增大称取的样本质量 |
| | 检测体系褪色 | 及时上机检测并避免一次性检测大量样本 |
| 检测结果过高 | 样本浓度太高 | 选择合适的稀释倍数 |

**声明**

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。