

# 水稻种子总淀粉含量的测定

## Determination of the Total Starch Content of Rice Seeds

李一博\*, 彭波

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [liyibo@mail.hzau.edu.cn](mailto:liyibo@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 李一博, 彭波. (2018). 水稻种子总淀粉含量的测定. *Bio-101* e1010161. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010161.

How to cite: Li, Y. B. and Peng, B. (2018). Determination of the total starch content of rice seeds. *Bio-101* e1010161. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010161. (in Chinese)

**实验原理** 二硝基水杨酸法是利用碱性条件下,二硝基水杨酸(Dinitrosalicylic acid, DNS)与还原糖发生氧化还原反应,生成3-氨基-5-硝基水杨酸,该产物在煮沸条件下显棕红色,且在一定浓度范围内颜色深浅与还原糖含量成比例关系的原理,用比色法测定还原糖含量的,进而计算出淀粉的含量。因其显色的深浅只与糖类游离出还原基团的数量有关,而对还原糖的种类没有选择性,故DNS方法适合用在多糖(如纤维素、半纤维素和淀粉等)水解产生的多种还原糖体系中。

**实验目的:** 检测水稻种子或者别的组织中还原糖含量,进而测定其中总淀粉的含量。

**关键词:** 水稻, 种子, 淀粉含量, 测定

### 材料与试剂

1. 牙签
2. 10 ml 离心管
3. 各种型号的吸头
4. 200 目筛子
5. 水稻种子
6. 葡萄糖苷酶 (Amyloglucosidase, Sigma, catalog number: A7095, USA)
7. pH 试纸 (Sigma, catalog number: 010B164536, USA)
8. 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) (Sigma, catalog number: G0550, USA)

9. 浓盐酸 (国药试剂, 分析纯)
10. NaAc (国药试剂, 分析纯)
11. KOH (国药试剂, 分析纯)
12. NaOH (国药试剂, 分析纯)
13. D 型无水葡萄糖 (国药试剂, 分析纯)
14. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (国药试剂, 分析纯)
15. 重蒸酚 (国药试剂, 分析纯)
16. 酒石酸钾钠 (国药试剂, 分析纯)
17. 0.4 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠缓冲液 (pH = 4.75)
18. DNS 试剂 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 移液器
2. 棕色试剂瓶
3. 离心机 (Eppendorf, model: centrifuge 5417R, USA)
4. 恒温摇床 (HDL, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)
5. 旋风式粉碎机 (Udy corporation, Colorado, USA)
6. 精米机 (JMJ-100 型, 铁岭精泰制米机械股份有限公司)
7. 电子天平 (OHAUS, USA)
8. 稻谷出糙机 (JLGJ4.5, 台州市粮仪厂)
9. 涡旋振荡器 (敖然科技有限公司)
10. 水浴锅 (武汉金宝华科技有限公司)
11. 酶标仪 (TECAN Infinite M200)
12. 酶标板 (Nunclon 96 Flat Transparent)

## 实验步骤

1. 水稻种子成熟收获后晒干或者烘干, 然后将种子进行脱粒处理。
2. 种子在室温保存 3 个月后利用稻谷垄谷机上脱壳得到糙米。
3. 将糙米在精米机上粉碎成精米。

4. 精米在旋风式粉碎机上粉碎成米粉。
5. DNS 试剂的制备 (见溶液配方 1)。
6. 样品葡萄糖的制备: 称取过 200 目筛子的米粉样品 50 mg (4 个空白对照各加 50  $\mu$ l 蒸馏水) 于 10 ml 离心管中, 用枪迅速加入 6 ml 2.5 mol·L<sup>-1</sup> KOH(40 °C), 加牙签后在室温下震荡 5 min, 使淀粉充分溶解后 40 °C 水浴 5 min 后再室温下震荡 5 min, 直至无生淀粉团生成, 去掉牙签; 加入 3 ml 0.4 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠缓冲液(pH = 4.75), 加入浓盐酸溶液(约 800  $\mu$ l)将样品溶液的 pH 值调至 4.75; 最后加入 60  $\mu$ l 葡萄糖苷酶, 于 130 rpm 转速摇床中在 60 °C 下作用 45 min; 之后再 6,000 rpm 4 °C 离心 2 min, 取上清稀释 10 倍后备用。用 DNS 法测定葡萄糖含量(见下所述), 50 mg 样品中总淀粉的含量等于葡萄糖含量乘以 0.9 (Goni 等, 1996)。
7. 葡萄糖标准曲线的绘制: 葡萄糖标准液梯度稀释(用蒸馏水稀释 D 型无水葡萄糖, 各 3 个重复): 4,000  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>→2,000→1,000→500→250→125→62.5→0  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>, 各吸取 0.2 ml 于 2 ml 离心管中, 分别准确加入 DNS 试剂 (见溶液配方) 0.4 ml, 沸水浴加热 5 min, 冰水混合物冷却 5 min, 再加 1.4 ml 的蒸馏水混匀, 各吸取 200  $\mu$ l 于 96 孔的白色酶标板中, 用多功能酶标仪 TECAN infinite M200 在 540 nm 波长下测定吸光度。
8. 样品葡萄糖含量的测定: 样品液及空白对照用蒸馏水稀释 10 倍后, 使糖浓度为 0.1-1.0 mg·ml<sup>-1</sup>, 各吸取稀释后的糖液 0.2 ml 于 2ml 离心管中, 分别准确加入 DNS 试剂 0.4 ml, 沸水浴加热 5 min, 冰水混合物冷却 5 min, 再加 1.4 ml 的蒸馏水混匀, 各吸取 200  $\mu$ l 于 96 孔的白色酶标板中, 用多功能酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光度, 从标准曲线算出葡萄糖  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> 数, 乘以 10 倍后求出样品中葡萄糖含量。
9. 打开并预热多功能酶标仪(测浓度可不用预热), 打开电脑→点击软件 Magellan→Create/edit a method→New/open→选 Nunclon 96 plat Transparent→选 96 孔有样的孔→双击左侧 Absorbance→选参数 540 nm、预振次数、测样点的数目等→保存方法于自己文件夹中→点 Start measurement→use predefined method→选你定的方法→开始→点 Edit 中 copy to excel→保存 excel 于自己文件夹中→退出, 保存 Results 文件。
10. 葡萄糖标准曲线及其方程式制备: 将葡萄糖的 OD 值及待测样品的 OD 值均减去空白对照的 OD 值→对葡萄糖 OD 值做散点图→划趋势线→点击趋势线点公式及

$R^2$  值,  $R^2$  值越接近 1, 曲线的线性化越好。

11. 根据 9 步骤中方程式及待测样品的 OD 值减去空白对照 OD 值算出各样品稀释 10 倍后的葡萄糖浓度值。
12.  $50 \text{ mg}$  样品中总淀粉的含量( $\%$ )= $\text{葡萄糖浓度值}(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})\times 10 \text{ 倍}\times 9.11 \text{ ml}\times 0.9/(50 * 1,000)$  (Goni 等, 1996)。

### 注意事项

1. 米粉要过 200 目的筛子, 以便取样均匀及酶解完全。
2. DNS 和 NaOH 的加入时间一定要很近, 或者是先加入 NaOH, 否则会产生难溶的沉淀, 导致配制溶液失败。
3. 在 DNS 试剂的制备过程中, 溶液加热温度不宜超过  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 溶液配方

1. DNS 试剂

3.15 g DNS

131 ml  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠

加到 250 ml 含有 91 g 酒石酸钾钠的热水溶液中

加上 2.5 g 重蒸酚和 2.5 g 亚硫酸钠

搅拌溶解, 冷却后加水定容到 500 ml (棕色瓶中备用)

### 参考文献

1. Goni, I., García-Diz, L., Mañas, E. and Saura-Calixto, F. (1996). [Analysis of resistant starch: a method for foods and food products](#). *Food Chemistry* 56: 445-449.