

TEST PROSEDÜRÜ:**A. Nişasta Ön İşlemi**

1. Nişasta veya un numunesini (20-25 mg ila en yakın 0,1 mg) 10 mL'lik vidalı kapaklı bir Kimax® numune tüpüne doğru şekilde tartın. Numune ağırlığını en yakın 0,1 mg hassasiyetle kaydedin.
NOT: Her seriye bir referans numunesi ekleyin. Her beşinci test örneğini çoğaltın.
2. Tüpe 1 mL DMSO ekleyin ve bir vorteks karıştırıcıda düşük hızda hafifçe karıştırın. Tüpün kapağını kapatın ve tüp içeriğini numune tamamen dağılına kadar (yaklaşık 1 dakika) kaynar su banyosunda ısıtın. Jelatinimsi nişasta topraklarının kalmadığından emin olun.
3. Sızdırmaz tüpün içeriğini bir vorteks karıştırıcı üzerinde yüksek hızda kuvvetlice karıştırın, tüpü bir kaynar su banyosuna yerleştirin ve bir vorteks karıştırıcı üzerinde aralıklı yüksek hızlı karıştırarak 15 dakika ısıtın.
4. Tüpü oda sıcaklığında yakl. 5 dakika ve bir vorteks karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırarak 2 mL %95 (h/h) etanol ekleyin. 4 mL daha etanol ekleyin, tüpü kapatın ve karıştırmak için ters çevirin. Bir nişasta çökeltisi oluşacaktır. Tüpün 15 dakika (veya istenirse gece boyunca) beklemesine izin verin.
5. Tüpleri 2.000 g'de 5 dakika santrifüjleyin, süpernatantı atın ve tüpleri 10 dakika kağıt mendil üzerinde boşaltın. Tüm etanolün boşaldığından emin olun. Sonraki amiloz ve nişasta belirlemelerinde peleti kullanın.
6. Nişasta topağına 2 mL DMSO (hafif girdaplı karıştırma ile) ekleyin. Tüpü 15 dakika kaynar su banyosuna yerleştirin ve ara sıra karıştırın. Jelatinimsi topraklar olmadığından emin olun.
7. Tüpleri kaynayan su banyosundan çıkarır çıkarmaz hemen 4 mL Con A solvent (Tampon 3; sayfa 4) ekleyin, iyice karıştırın ve ardından tüp içeriğini (Con A solvent ile tekrar tekrar yıkayarak) kantitatif olarak 25 mL'lik bir banyoya aktarın. hacimsel şişesi. Con A çözücüsü ile hacme seyreltin (bu, Çözüm A'dır). Gerekirse, bu solüsyonu Whatman® No. 1 filtre kağıdından süzün (bu adım tam un numuneleri için gerekli olacaktır).

NOT: Bu çözüm 2 saat içinde analiz edilmelidir.

B. Con A Amilopektinin Çökeltilmesi ve Amiloz Tayini

1. 1,0 mL Solüsyon A'yı 2,0 mL Eppendorf® mikrofüj tüpüne aktarın. 0,50 mL Con A solüsyonu (şişe 1) ekleyin, tüpü kapatın ve tekrar tekrar ters çevirerek hafifçe karıştırın. Numunenin köpürtülmesinden kaçının.
2. Tüpü oda sıcaklığında 1 saat bekletin. Oda sıcaklığında bir mikrofüjde 10 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüjleyin.
3. 1 mL süpernatantı 15 mL santrifüj tüpüne aktarın. 3 mL 100 mM sodyum asetat tamponu, pH 4.5 ekleyin. Bu, pH'ı ~ 5'e düşürür. Con A'yı denatüre etmek için içeriği karıştırın, hafifçe tıpayı (bir bilyeyle) ve kaynar su banyosunda 5 dakika ısıtın.
4. Tüpü 40°C'deki bir su banyosuna yerleştirin ve 5 dakika dengelenmesine izin verin. 0,1 mL amiloglukosidaz/ α -amilaz enzim karışımı (sayfa 3; solüsyon 2) ekleyin ve 40°C'de 30 dakika inkübe edin.
Tüpü 2.000 g'de 5 dakika santrifüjleyin.
5. Süpernatantın 1,0 mL'lik alikotlarına 4 mL GOPOD Reaktif (Reaktif B) ekleyin. 40°C'de 20 dakika inkübe edin. Kör Reaktif ve D-Glikoz Kontrollerini aynı anda inkübe edin.

NOT:

Kör Reaktif, 4,0 mL GOPOD Reaktifine 1,0 mL 100 mM sodyum asetat tamponu (Tampon 1; sayfa 4) eklenerek ve 40°C'de 20 dakika inkübe edilerek hazırlanır.
D-Glikoz Kontrolleri (iki kopya), 0,1 mL D-glikoz standart solüsyonu (1 mg/mL), 0,9 mL sodyum asetat tamponu ve 4,0 mL GOPOD Reaktif içerir. Bu değer hesaplamada kullanılmaz, ancak testin bu kısmında herhangi bir sorun olmamasını sağlamak için yapılmasını öneririz.

6. Reaktif körüne karşı 510 nm'de her örneğin ve D-glikoz kontrollerinin absorbansını okuyun.

C. Toplam Nişasta Tayini

1. 0,5 mL Solüsyon A'yı 4 mL 100 mM sodyum asetat tamponu, pH 4,5 ile karıştırın.
2. 0,1 mL amiloglukosidaz/ α -amilaz solüsyonu ekleyin ve karışımı 40°C'de 10 dakika inkübe edin.
3. Bu çözeltinin 1,0 mL'lik kısımlarını (çift kopya halinde) cam test tüplerine aktarın, 4 mL GOPOD Reaktifi (çözelti 4) ekleyin ve iyice karıştırın. 40°C'de 20 dakika inkübe edin. Bu inkübasyon, yukarıdaki Bölüm B'deki numuneler ve standartlarla eşzamanlı olarak gerçekleştirilmelidir.