

# 马铃薯块茎淀粉组分高效检测体系的建立及应用

宋玉浩\*, 史伟玲\*, 张 娇, 丁振宇, 彭洪娴, 蒋春燕, 马秋芹, 李芝静, 赵 勇, 唐道彬, 张 凯, 王季春, 刘 勋\*\*

(西南大学农学与生物科技学院, 薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室, 重庆 400715)

**摘 要:** 马铃薯块茎淀粉组分(直链/支链淀粉比 AM/AP)影响淀粉特性以及决定其在食品和其他工业上的应用。AM/AP 的测定对其合理利用以及选育特异淀粉组分的专用品种等具有重要意义。采用 96 孔板双波长法对马铃薯不同 AM/AP 比率标准样品进行测试, 发现当测试样品 AM/AP 比率超过制作标准曲线的 AM/AP 比率(33.3%)时, 测试结果明显高估直链淀粉含量。基于 96 孔板的碘染分析, 建立了马铃薯 AM/AP 比率和最大吸收峰下波长的标准曲线:  $y = 601.88 x^{0.0215}$ ,  $R^2 = 0.9999$ 。该方法进一步提高了测试准确度和应用范围。利用该方法测试了 198 个马铃薯品种(系)以及高直链淀粉组分的转基因块茎, 明确了收集的马铃薯品种(系)的直链淀粉组成范围为 17.4%~33.3%。新建立的马铃薯淀粉组分测试方法为高效准确筛选遗传育种材料以及改良淀粉组分株系提供了方便。

**关键词:** 马铃薯; 淀粉组分; 检测体系; 直链淀粉; 支链淀粉

**中图分类号:** S 532

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2021) 03-0600-09

## Development and Application of an Efficient Method for the Amylose/Amylopectin Ratio Determination in Potato Tubers

SONG Yuhao\*, SHI Weiling\*, ZHANG Jiao, DING Zhenyu, PENG Hongxian, JIANG Chunyan, MA Qiuqin, LI Zhijing, ZHAO Yong, TANG Daobin, ZHANG Kai, WANG Jichun, and LIU Xun\*\*

(Chongqing Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement in Tuber and Root Crops, College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Potato starch composition (amylose/amylopectin, AM/AP) influences functional characteristics for food and other industrial applications. The determination of AM/AP ratio is of great significance for rational utilization of starch and breeding special varieties with specific starch components. The dual-wavelength method for determination of AM and AP contents was established in a 96-well plate format firstly. It was identified that the AM contents was dramatically overestimated when the AM/AP ratio of tested samples exceeded the AM/AP ratio (33.3%) of the standard curve. Furthermore, the new standard curve of potato AM/AP ratio and wavelength under the maximum absorption peak were

**收稿日期:** 2020-07-10; **修回日期:** 2021-01-10

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31571728); 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jcsx-gksbX0157); 西南大学基本科研业务费专项资金项目(XDJK2019D023); 国家重点研发计划项目(2018YFE0127900)

\* 同等贡献作者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuxun828@swu.edu.cn)

established:  $y = 601.88x^{0.0215}$ ,  $R^2 = 0.9999$ . This method further improves the accuracy and is applicable over large ranges of AM/AP ratio needed for screening. This method was used to determine the AM/AP ratio from 198 potato varieties (lines) and a few transgenic tubers with high amylose contents. The result revealed that the range of AM contents in our potato genetic resources is 17.4% - 33.3%. In conclusion, a simple and efficient method for the accurate estimation of the potato starch composition was established which is especially suitable for the detection of genetic breeding materials and improvement starch composition lines.

**Keywords:** potato; starch component; detection system; amylose; amylopectin

淀粉在植物种子、果实、根和茎等部位积累, 是植物贮存营养的一种主要形式, 也是人类粮食、动物饲料和工业原料的重要来源 (Schirmer et al., 2013)。淀粉从分子结构上可分为直链淀粉 (Amylose, AM) 和支链淀粉 (amylopectin, AP) 两大类。AM/AP 比率是决定淀粉性质和用途的重要指标, 不同淀粉组分在食品加工和工业应用中具有不同的用途。AM 含量是影响加工特性的重要因素, 是评价品质的 1 个重要指标 (Delwiche et al., 1995); AP 含量增加使淀粉品质整体优化, 可作为优良的增稠剂、乳化剂、黏着剂、悬浮剂而广泛地应用于食品、造纸、纺织等工业 (罗发兴 等, 2007)。在天然淀粉中, AM 和 AP 的含量与淀粉的来源有关, 大多数原料中含直链淀粉 20% ~ 30%、支链淀粉 70% ~ 80%。工业上通常采用不同的工艺分离 AM 和 AP 或生产变性淀粉拓宽其应用范围, 但产品生产成本低, 而且会导致严重的水污染。研究人员利用天然突变或基因操作筛选和创制了一系列不同淀粉组分的作物品种或材料, 如高 AM 或高 AP 含量的水稻 (Sun et al., 2017; Fei et al., 2019)、玉米 (Guan et al., 2011; Zhao et al., 2015)、马铃薯 (Schwall et al., 2000; Hofvander et al., 2004; 郭志鸿 等, 2008) 和甘薯 (Kitahara et al., 2007) 等。AM/AP 比率测定对淀粉类作物的合理加工, 淀粉的合理利用, 农业选种和育种等均具有重要意义。

大量研究者建立了多种测定 AM/AP 含量的方法, 包括商业化的酶法 (K-AMYL, Megazyme International, Ireland), 由于这些方法费时费力且费用高, 在大量材料鉴定上应用受限。基于碘染显色原理开发的双波长法具有较准确和方便的优势 (Zhu et al., 2008), 逐渐应用于不同作物中, 但会高估 AM 含量 (Kaufman et al., 2015)。由于不同作物来源的淀粉特性不同, 与碘结合存在一定差异, 淀粉标准品和测试淀粉物种来源不一致可能是导致检测误差的原因之一 (戴双 等, 2008)。另外, 测试样品淀粉组分偏离制作标准曲线的淀粉组分也可能导致检测误差 (Willims et al., 1970)。因此, 利用本物种的淀粉标准品制作标准曲线, 能最大限度减少检测误差。

商业化的马铃薯 AM 和 AP 标准品为提高测定马铃薯 AM/AP 比率准确性奠定了良好的基础。本研究中采用商业化的马铃薯 AM 和 AP 标准品, 通过优化碘染显色操作过程, 建立基于 96 孔板的双波长法马铃薯淀粉组分检测体系, 明确该方法检测结果的准确度及其对淀粉组分检测的适应范围, 同时探索建立一种简单、准确度高和应用范围广的马铃薯淀粉组分检测新体系, 为高通量准确筛选遗传育种材料以及淀粉突变体或基因工程改良淀粉组分株系提供简单高效的方法。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试材与仪器设备

试材为来源于薯类生物学与遗传育种重庆市重点实验室北碚育种基地 (29°46'N, 106°21'E) 的

马铃薯 198 个常规品种 (系), 以及温室盆栽的同时干涉 *SBE I* 和 *SBE II* 转基因马铃薯株系。各材料选取无病虫害的块茎 3~5 个切碎, 80 °C 烘干后研磨过 60 目筛 (张娇, 2018) 备用。

仪器与设备为 JA2003A 电子天平 (上海精天电子仪器有限公司)、Sorvall ST16R 通用台式离心机 (Thermo Scientific, USA)、HWS-24 恒温水浴锅 (上海齐欣科学仪器有限公司)、Infinite 200 PRO 多功能微孔板检测仪 (Tecan, Swiss) 和 RVC 2-18 CD plus 真空冷冻离心浓缩仪器 (Christ, Germany)。

## 1.2 碘试剂以及直链淀粉和支链淀粉标准液的配制

称 5 g 碘化钾溶于 50 mL 蒸馏水, 然后把 2.5 g 碘溶于碘化钾溶液中, 充分搅拌后即成碘试剂原液, 使用时取 1 份原液加 9 份纯水稀释。马铃薯 AM 和 AP 标准品均购于 Sigma-Aldrich 公司。准确称量 100 mg 的 AM 和 AP 标准品, 加入 10 mL KOH 溶液 ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 沸水浴 60 min, 期间搅拌几次至完全溶解, 待冷却后用蒸馏水定容到 100 mL, 即成为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  AM 和 AP 标准液。

## 1.3 基于 96 孔板的双波长法检测马铃薯直链淀粉和支链淀粉含量的标准曲线制备

分别吸取 AM 标准液 50  $\mu\text{L}$  和 AP 标准液 150  $\mu\text{L}$ , 加入纯水至 1 mL, 在 96 孔板中分别加入 10  $\mu\text{L}$  标样、90  $\mu\text{L}$  醋酸盐缓冲反应液 (pH 3.5) 和 100  $\mu\text{L}$  的碘试剂, 以 10  $\mu\text{L}$  纯水、90  $\mu\text{L}$  醋酸盐缓冲反应液 (pH 3.5) 和 100  $\mu\text{L}$  的碘试剂为空白对照在多功能微孔板检测其可见光段吸光度, 扫描波长范围 400~900 nm, 间隔 1 nm 读数, 由此得到 AM 和 AP 的扫描光谱图谱, 根据双波长法等吸收原理, 采用作图法选定 AM 测定波长  $\lambda_1$  和参比波长  $\lambda_2$ , 以及 AP 测定波长  $\lambda_3$  参比波长  $\lambda_4$ 。

分别取 AM 标准液 0、20、40、60、80、100、120、140、160、180 和 200  $\mu\text{L}$  于 2 mL 离心管中, 分别加入纯水至 1 000  $\mu\text{L}$ 。每份标样分别取 10  $\mu\text{L}$  标液与 90  $\mu\text{L}$  醋酸盐缓冲液 (pH 3.5) 及 100  $\mu\text{L}$  的碘试剂混合反应, 以 100  $\mu\text{L}$  醋酸盐缓冲反应液 (pH 3.5) 和 100  $\mu\text{L}$  碘试剂混合反应为对照, 在多功能微孔板检测仪检测  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  吸光值, 制作 AM 含量标准曲线。分别取 AP 标准液 0、50、100、150、200、250、300、350、400、450 和 500 于 2 mL 离心管中, 加入蒸馏水到 1 000  $\mu\text{L}$ , 按照和 AM 标准曲线制作方法测定  $\lambda_3$  和  $\lambda_4$  吸光值, 制作 AP 标准曲线。

## 1.4 双波长法对不同淀粉组分样品准确性评价

分别将 AM 和 AP 标准液按照 AM+AP (单位均为  $\mu\text{L}$ ) 为 0+100、5+95、10+90、20+80、30+70、40+60、50+50、60+40、70+30、80+20、90+10 和 100+0 混合成  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的淀粉浓度样品, 按照双波长方法检测各混合液  $\lambda_1 \sim \lambda_4$  吸光值。每个样品平行 3 次重复试验, 每个测量值 3 次技术重复, 计算平均测量值, 评价样品的回收率。

## 1.5 淀粉组分比与最大吸收峰波长曲线关系建立

将样品分别在多功能微孔板检测仪检测其可见光段吸光度, 扫描波长范围 400~900 nm, 每隔 1 nm 读数, 确定最大吸收峰的波长。以 AM/AP 比值与最大吸收峰的波长拟合函数, 建立淀粉组分比的标准曲线。

## 1.6 马铃薯块茎样品淀粉组分测试

取 10~30 mg 块茎干粉于 2 mL 离心管, 加入 90%乙醇 85 °C 水浴 30 min, 去除上清液, 重复 2 次, 沉淀真空冻干。沉淀加入 1 mL KOH 溶液 ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 沸水浴 60 min, 期间摇晃几次使其充分溶解, 待冷却后  $8\ 000 \times g$  离心 2 min, 吸取上清液 100  $\mu\text{L}$  到 1.5 mL 离心管, 再加入 900  $\mu\text{L}$  纯水为样品待测液。每个样品 3 次生物学重复, 测定过程与标准曲线测定一致。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯直链和支链淀粉含量双波长法检测体系的建立

将  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 AM 和  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 AP 在多功能微孔板检测仪上进行了  $400 \sim 900 \text{ nm}$  的吸收光谱测定, 采用作图法确定 AM 的测定波长  $\lambda_1 = 620 \text{ nm}$ , 参比波长  $\lambda_2 = 507 \text{ nm}$ ; AP 的测定波长  $\lambda_3 = 560 \text{ nm}$ , 参比波长  $\lambda_4 = 727 \text{ nm}$  (图 1)。

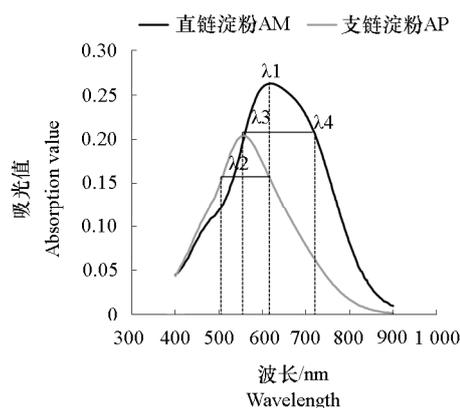


图 1 马铃薯双波长法的参比波长  
Fig. 1 Potato dual-wavelength reference wavelength

在  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  两波长处分别测定 AM—碘复合物的吸光值  $A$ , 以  $y = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$  为纵坐标, AM 质量浓度为横坐标 ( $x$ ), 绘制双波长 AM 标准曲线 (图 2, A), AM 浓度在  $0 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内, 回归方程为  $y = 1.2318x + 0.0004$ ,  $R^2 = 0.9995$ 。在  $\lambda_3$  和  $\lambda_4$  两波长处分别测定 AP—碘复合物的吸光值  $A$ , 以  $y = A_{\lambda_3} - A_{\lambda_4}$  为纵坐标, AP 质量浓度为横坐标 ( $x$ ), 绘制双波长 AP 标准曲线, 图 2, B, AP 质量浓度在  $0 \sim 0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的范围内, 回归方程  $y = 0.7576x - 0.0026$ ,  $R^2 = 0.9992$ 。通过参比波长绘制相应的标准曲线, 标准曲线的决定系数均超过了 0.999, 达到极显著水平, 说明均较好。

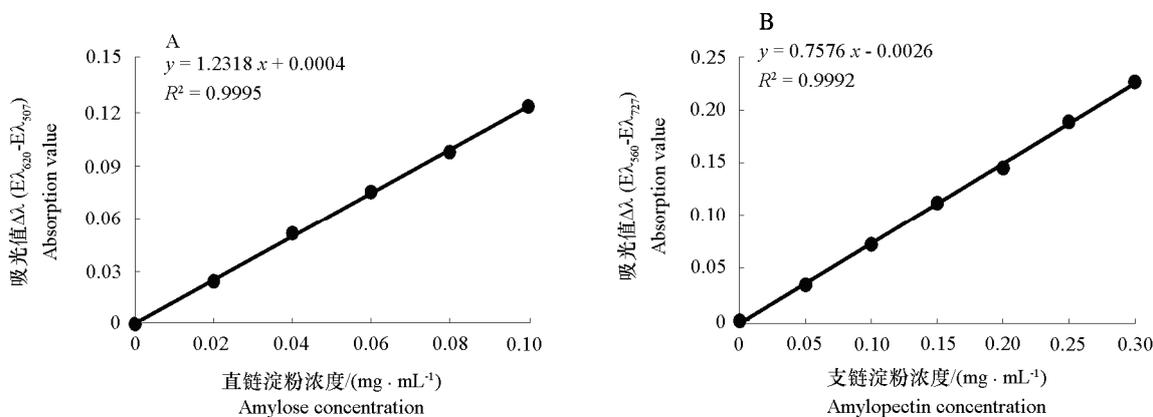


图 2 马铃薯直链 (A) 和支链淀粉 (B) 含量标准曲线  
Fig. 2 The standard curve of amylose (A) and amylopectin (B) content in potato

## 2.2 双波长法对不同马铃薯淀粉组分样品的准确度测试

利用标准 AM + AP 样品混合进行回收率检测。结果如表 1 所示, 当 AM 的比例  $\leq 20\%$  时, AM 和 AP 回收率分别为  $102.1\% \sim 104.5\%$  和  $95.9\% \sim 100.1\%$ , 说明在这些样品中 AM 和 AP 含量测试值和实际值接近, 测试准确度较高。当样品 AM 的比例在  $30\% \sim 60\%$ , AM 的回收率在  $118.2\% \sim 129.3\%$ , AP 的回收率在  $102.2\% \sim 103.4\%$ , 说明这些样品中 AM 测试值明显高于实际值, 测试准确度不高, AP 含量测试值与实际值仍接近, 测试准确度较高。当 AM 的比例在  $70\%$  以上时, AM 和 AP 回收率分别在  $109.8\% \sim 121.3\%$  和  $114.0\% \sim 210.0\%$  之间, 说明在这些样品中 AM 和 AP 含量测试值均高于实际值, 测试准确度较低。综上, 该方法测定淀粉组分时对样品的淀粉组成含量有限定范围, 当淀粉中 AM 含量超过  $30\%$ , 该测定方法明显高估其含量。

表 1 马铃薯直链和支链淀粉含量回收率  
Table 1 Recycling rate of potato amylose and amylopectin

AM + AP 标准样品/ $\mu\text{L}$ Standard AM + AP	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Measured value			回收率/% Recycling rate		
	AM	AP	TS	AM	AP	TS
5.0 + 95.0	5.2 $\pm$ 0.1	93.2 $\pm$ 0.2	98.4 $\pm$ 0.2	104.1	98.1	98.8
10.0 + 90.0	10.2 $\pm$ 0.1	86.4 $\pm$ 0.5	96.6 $\pm$ 0.4	102.1	95.9	96.6
20.0 + 80.0	20.9 $\pm$ 0.2	80.1 $\pm$ 0.2	101.0 $\pm$ 0.3	104.5	100.1	101.0
30.0 + 70.0	35.5 $\pm$ 0.4	71.5 $\pm$ 0.2	107.0 $\pm$ 0.1	118.2	102.2	107.0
40.0 + 60.0	51.7 $\pm$ 0.2	61.4 $\pm$ 0.2	113.1 $\pm$ 0.2	129.3	102.3	113.1
50.0 + 50.0	63.2 $\pm$ 0.1	51.7 $\pm$ 0.1	114.9 $\pm$ 0.2	126.4	103.4	114.9
60.0 + 40.0	71.6 $\pm$ 0.2	41.1 $\pm$ 0.1	112.7 $\pm$ 0.2	119.3	102.8	112.7
70.0 + 30.0	84.9 $\pm$ 0.4	34.2 $\pm$ 0.1	119.1 $\pm$ 0.3	121.3	114.0	119.1
80.0 + 20.0	93.3 $\pm$ 0.3	24.5 $\pm$ 0.2	117.8 $\pm$ 0.2	116.6	122.5	117.8
90.0 + 10.0	98.8 $\pm$ 0.4	21.0 $\pm$ 0.5	119.8 $\pm$ 0.4	109.8	210.0	119.8

注: AM: 直链淀粉; AP: 支链淀粉; TS: 总淀粉。测定值数据表示为平均值  $\pm$  标准误。下同。

Note: AM: Amylose; AP: Amylopectin; TS: Total starch. Measured value data were shown as mean  $\pm$  standard error. The same below.

## 2.3 马铃薯直链和支链淀粉组成与最大吸收峰的关系

利用不同比例 AM + AP 淀粉样品, 扫描  $400 \sim 900 \text{ nm}$  下吸光值, 确定了各自波峰波长值(表 2)。

表 2 不同淀粉组分的最大吸收峰波长  
Table 2 The wavelength with maximum absorption value of different starch components

AM + AP 标准样品/ $\mu\text{L}$ Standard AM + AP	直/支比率 AM/AP	最大吸收峰波长/nm Maximum absorption peak wavelength	AM+AP 标准样品/ $\mu\text{L}$ Standard AM + AP	直/支比率 AM/AP	最大吸收峰波长/nm Maximum absorption peak wavelength
0.0 + 100.0	0	560	50.0 + 50.0	1.000	602
5.0 + 95.0	0.053	565	60.0 + 40.0	1.500	607
10.0 + 90.0	0.111	574	70.0 + 30.0	2.333	613
20.0 + 80.0	0.250	584	80.0 + 20.0	4.000	620
30.0 + 70.0	0.429	591	90.0 + 10.0	9.000	620
40.0 + 60.0	0.677	597	100.0 + 0.0	$+\infty$	620

通过回归分析发现, AM/AP 比率在  $0.053 \sim 4.000$  范围内, AM/AP 比率和最大吸光值的波长之间存在幂函数关系:  $y = 601.88x^{0.0215}$ ,  $R^2 = 0.9999$  (图 3), 说明可以通过淀粉与  $\text{I}_2\text{-KI}$  反应的最大吸收峰值的波长预测马铃薯淀粉中 AM/AP 比率。

为了明确淀粉浓度是否对该曲线最大吸收峰的波长有影响, 对 10、40、80、160、200 和 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  淀粉浓度下的 AM/AP 为 0.25 和 0.50 的样品分别进行同样的分析, 其最大吸收峰的波长分别稳定在 584 nm 和 602 nm, 说明至少在 10 ~ 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的淀粉浓度范围内, 淀粉浓度不影响 AM/AP 比率与最大吸收峰波长之间的函数关系, 表明该方法具有在广泛淀粉浓度范围内 AM/AP 比率的检测潜力。

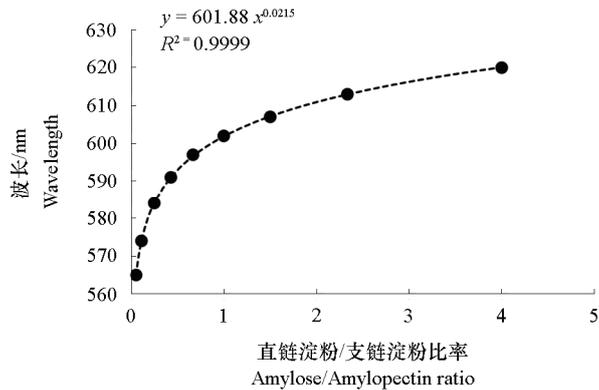


图3 淀粉组成比率和最大吸光值下波长的函数关系

Fig. 3 The functional relationship between starch composition and wavelength with the maximum absorbance value

## 2.4 马铃薯品系直链和支链淀粉比的检测应用

选取了 198 个马铃薯品种(系)以及由 RNAi 抑制淀粉分支酶基因 *SBE I* 和 *SBE II* 创制的高 AM 含量的 12 个转基因株系块茎进行检测。结果(图 4)显示, 198 个马铃薯品种(系)中块茎淀粉的最大吸收峰波长范围在 582 ~ 593 nm 之间。依据图 3 中的函数关系计算对应的 AM 含量在 17.4% ~ 33.3% 之间, 平均为 24.4%。其中最大吸收峰波长范围在 585 ~ 591 nm (即 AM 含量在 20% ~ 30%) 之间的材料占测试样品的 86.4%, 最大吸收峰波长小于 585 nm (AM 含量低于 20%) 的材料占比 11.1%, 最大吸收峰波长大于 591 nm (AM 含量超过 30%) 的材料占比 2.5%。

如图 5 所示, 12 个转基因株系淀粉最大吸收峰波长均高于野生型, 说明其 AM 含量提高, 其中 4 个转基因株系淀粉最大吸收峰大于 594 nm, 即 AM 含量超过 35%。这些测试结果说明该方法能应用在马铃薯淀粉组分分析。

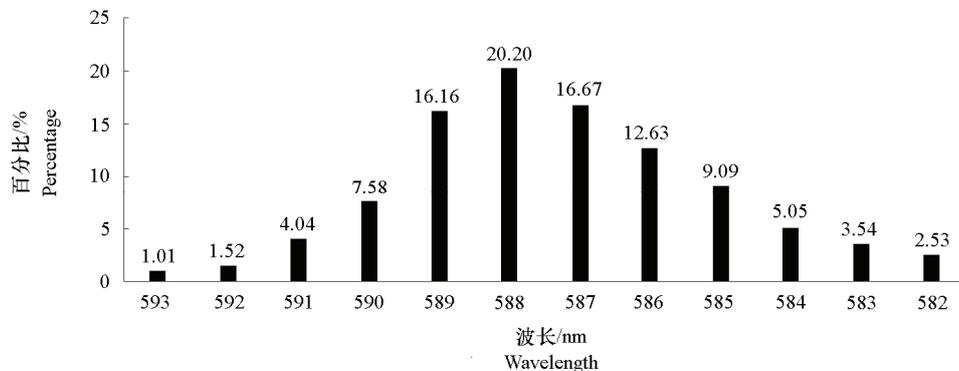


图4 198份马铃薯品种(系)淀粉组分

Fig. 4 Determination of AM/AP ratio in 198 potato varieties (lines)

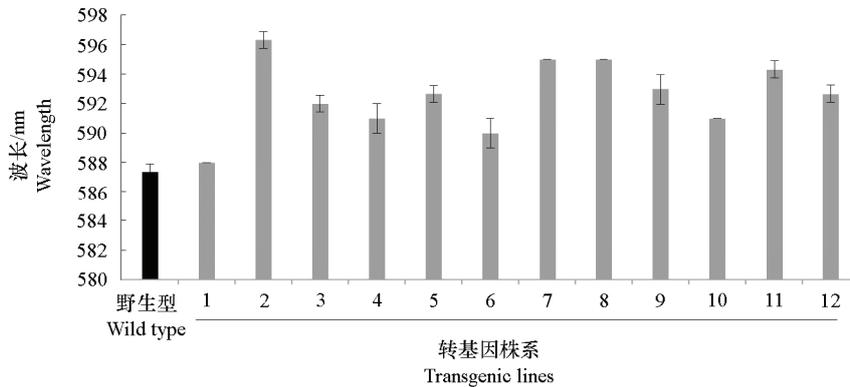


图5 转基因株系中淀粉组分

Fig. 5 Determination of AM/AP ratio in transgenic lines

### 3 讨论

与其他淀粉（如玉米淀粉、木薯淀粉）相比，马铃薯淀粉具有糊化温度低、黏度高、透明度高、膨胀度大等独特性质，在化工行业上的应用具有优势（Singh & Kaur, 2016）。由于 AM 具成膜性好、胶凝温度低、不易被人体吸收等特性，在食品、医疗、纺织、造纸、包装、石油、环保、光纤、高精度印刷线路板和电子芯片等行业有着广泛的应用。马铃薯 AP 在稳定性、溶解性、粘滞性、透明性和不易凝沉等方面性能优良，广泛应用于造纸、纺织、建筑和石油化工产业，在食品行业更具有潜在应用价值。目前种植的马铃薯栽培品种 AP 含量为总淀粉含量的 70% ~ 80%，AM 含量仅为总淀粉含量的 20% ~ 30%（吕文河等, 2017; Ngobese et al., 2017）。分别从淀粉中分离 AM 和 AP 的产率有限，而且成本高，限制了开发和应用。马铃薯淀粉组分差异也影响淀粉不同变性过程中的反应性（Copeland et al., 2009）。明确马铃薯资源的淀粉组分，对合理利用具有指导意义。培育特异淀粉组分含量的马铃薯新品种，对于拓展马铃薯淀粉应用领域，促进马铃薯产业的发展及提高经济效益亦具有重要意义。快速准确的马铃薯淀粉组分检测方法能为种质资源评价以及加速特异淀粉组分品种的选育进程提供技术支撑。

在大量育种材料淀粉组分评价或突变体筛选过程中，具有应用价值的测试方法通常需要兼具低成本、简单高效和高准确性等优势。K-AMYL 商业酶法试剂盒测定 AM/AP 准确度高，但操作过程费时费力成本高，对于大样品量的筛选并不经济。基于碘染的比色法具有较好的经济性，已有报道分别用马铃薯 AM 和 AP 的最大吸收峰的吸光值比值快速评估 AM/AP 比值的方法，但该方法会高估 AM 含量（Hovenkamp-Hermelink et al., 1988; Fajardo et al., 2013）。开发的双波长法克服了单波长法的局限性，能大幅度提高测定的灵敏度、选择性和准确度（Zhu et al., 2008; 杨焕春等, 2015）。在双波长法检测淀粉组分时，通常采用 KOH 溶解淀粉样品，但淀粉-碘复合物在 pH 3 ~ 5 范围内稳定，因此测试前需要对淀粉样品溶液进行 pH 调整，然后再定容待测样品，而且测试设备常用分光光度计进行单样品检测，测试程序较繁琐，检测效率也较低。为了简化操作过程以及提高检测效率，本研究一方面在样品测试前统一按碱抽提的样品和醋酸盐缓冲液（pH 3.5）体积比 1:9 混合，保障反应体系 pH 值稳定在测试要求的范围内，另一方面利用可同时检测 96 个样品的多功能微孔板检测仪来提高检测效率。利用 96 孔板的容量，设计 200  $\mu$ L 测试体积，分别为 10  $\mu$ L 样品溶液、90  $\mu$ L 醋酸盐缓冲液（pH 3.5）和 100  $\mu$ L I<sub>2</sub>-KI 溶液为反应体系，样品反应后直接利用多功能微孔板检测仪

中振荡功能进行混匀和设置稳定的测试温度, 减小环境温度变化对测试结果的影响, 进一步减少操作环节并提高检测的稳定性, 而且减少了试剂的用量, 节约了测试成本。

利用该方法对不同淀粉组分样品的准确性进行测试, 发现样品淀粉组分偏离制作标准曲线的淀粉组分时, 增加了测量误差, 尤其是对高 AM 含量的样品误差较大, 影响了测试的准确性和应用范围。测定中发现 AM/AP 比率在 0.053 ~ 4.000 范围内, 最大吸收峰值的波长与 AM/AP 比率呈现幂函数关系: ( $y = 601.88x^{0.0215}$ ,  $R^2 = 0.9999$ ), 说明可以通过淀粉与 I<sub>2</sub>-KI 反应的最大吸收峰值波长准确预测马铃薯 AM/AP 比率。对不同浓度淀粉含量的各种淀粉组分的样品进行测试, 发现相同淀粉组分与 I<sub>2</sub>-KI 反应的最大吸收峰值波长非常稳定, 进一步说明该方法具有高精确度和准确性, 扩大了对淀粉组分检测范围。利用该方法对 198 个马铃薯常规品种 (系) 资源进行了检测, 最大吸收峰波长在 582 ~ 593 nm 范围内, 即 AM 含量为 17.54% ~ 33.35%, 平均 24.4%, 该结果与之前报道的马铃薯常规品种 (系) AM 含量范围 (宿飞飞 等, 2006; 曾凡逵 等, 2012; Šimková et al., 2013) 基本一致。另外对 RNAi 同时干涉 *SBE I* 和 *SBE II* 的 12 个转基因株系的块茎进行了分析, 发现转基因株系块茎淀粉最大吸收峰波长均高于野生型, 即高 AM 含量, 与前人研究报道 (郭志鸿 等, 2008) 基本一致, 说明该方法对于高 AM 含量的样品同样适用。

本研究建立了一种基于 96 孔板的简单高效准确检测马铃薯淀粉组分的新方法, 该方法简化了测试流程, 节省操作时间和试剂用量。相对双波长法, 该方法无需精确称量样品质量、提高了准确度、拓宽了样品应用范围, 尤其适宜早代马铃薯材料以及突变体和遗传操作转基因材料淀粉组分的高通量筛选。

## References

- Copeland L, Blazek J, Salman H, Tang M C. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*, 23 (6): 1527 - 1534.
- Dai Shuang, Cheng Dun-gong, Li Hao-sheng, Liu Ai-feng, Liu Jian-jun, Zhao Zhen-dong, Song Jian-min. 2008. Simultaneous and rapid spectrophotometric determination of amylose, amylopectin, and total starch in wheat grain. *Journal of Triticeae Crops*, 28 (3): 442 - 447. (in Chinese)
- 戴 双, 程敦公, 李豪圣, 刘爱峰, 刘建军, 赵振东, 宋健民. 2008. 小麦直、支链淀粉和总淀粉含量的比色快速测定研究. *麦类作物学报*, 28 (3): 442 - 447.
- Delwiche S R, Bean M M, Miller R E, Webb B D, Williams P C. 1995. Apparent amylose content of milled rice by near-infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chemistry*, 72 (2): 182 - 187.
- Fajardo D, Jayanty S S, Jansky S H. 2013. Rapid high throughput amylose determination in freeze dried potato tuber samples. *Journal of Visualized Experiments*, 80: e50407 - e504407.
- Fei Y Y, Yang J, Wang F Q, Fan F J, Li W Q, Wang J, Xu Y, Zhu J Y, Zhong W G. 2019. Production of two elite glutinous rice varieties by editing *Wx* gene. *Rice Science*, 26 (2): 118 - 124.
- Guan S Y, Wang P W, Liu H J, Liu G N, Ma Y Y, Zhao L N. 2011. Production of high-amylose maize lines using RNA interference in *sbe2a*. *African Journal of Biotechnology*, 10 (68): 15229 - 15237.
- Guo Zhi-hong, Zhang Jin-wen, Wang Di, Chen Zheng-hua. 2008. Using RNAi technology to produce high-amylose potato plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (2): 494 - 501. (in Chinese)
- 郭志鸿, 张金文, 王 蒂, 陈正华. 2008. 用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料. *中国农业科学*, 41 (2): 494 - 501.
- Hofvander P, Andersson M, Larsson C, Larsson H. 2004. Field performance and starch characteristics of high-amylose potatoes obtained by antisense gene targeting of two branching enzymes. *Plant Biotechnology Journal*, 2 (4): 311 - 320.
- Hovenkamp-Hermelink J, Devries J, Adamse P, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra W. 1988. Rapid estimation of the amylose amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. *Potato Research*, 31: 241 - 246.

- Kaufman R C, Wilson J D, Bean S R, Herald T J, Shi Y C. 2015. Development of a 96-well plate iodine binding assay for amylose content determination. *Carbohydrate Polymers*, 115: 444 - 447.
- Kitahara K, Hamasuna K, Nozuma K, Otani M, Hamada T, Shimada T, Fujita K, Suganuma T. 2007. Physicochemical properties of amylose-free and high-amylose starches from transgenic sweetpotatoes modified by RNA interference. *Carbohydrate Polymers*, 69 (2): 233 - 240.
- Luo Fa-xing, Huang Qiang, Zhang Le-xing. 2007. The study and development of waxy potato. *Food Research and Development*, 28 (7): 148 - 149. (in Chinese)  
罗发兴, 黄强, 张乐兴. 2007. 蜡质马铃薯淀粉的研究开发. *食品研究与开发*, 28 (7): 148 - 149.
- Lü Wen-he, Huo Dan-dan, Li Yong, Lü Dian-qiu, Bai Ya-mei, Su Fei-fei. 2017. Comparison of starch contents and starch synthase activities in different parts of potato tuber. *Journal of Northeast Agricultural University*, 48 (6): 1 - 8. (in Chinese)  
吕文河, 霍丹丹, 李勇, 吕典秋, 白雅梅, 宿飞飞. 2017. 马铃薯块茎不同部位淀粉含量及淀粉合成关键酶活性差异比较. *东北农业大学学报*, 48 (6): 1 - 8.
- Ngobese N Z, Workneh T S, Alimi B A, Tesfay S. 2017. Nutrient composition and starch characteristics of eight European potato cultivars cultivated in South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 55: 1 - 11.
- Schirmer M, Hochstotter A, Jekle M, Arendt E, Becker T. 2013. Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids*, 32 (1): 52 - 63.
- Schwall G P, Safford R, Westcott R J, Jeffcoat R, Tayal A, Shi Y C, Gidley M J, Jobling S A. 2000. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology*, 18 (5): 551 - 554.
- Šimková D, Lachman J, Hamouz K, Vokál B. 2013. Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorus content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. *Food Chemistry*, 141 (4): 3872 - 3880.
- Singh J, Kaur L. 2016. *Advances in potato chemistry and technology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Press.
- Su Fei-fei, Shi Ying, Liang Jing, Zhao Gui-yun, Chen Yi-li. 2006. Evaluation of different potato varieties for starch content, starch yield and starch component. *Chinese Potato Journal*, 20 (1): 16 - 18. (in Chinese)  
宿飞飞, 石瑛, 梁晶, 赵桂云, 陈伊里. 2006. 不同马铃薯品种淀粉含量、淀粉产量及淀粉组成的评价. *中国马铃薯*, 20 (1): 16 - 18.
- Sun Y W, Jiao G A, Liu Z P, Zhang X, Li J Y, Guo X P, Du W M, Du J L, Francis F, Zhao Y D, Xia L Q. 2017. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 8: 298.
- Willims P C, Kuzina F D, Hlynka I. 1970. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. *Cereal Chemistry*, 47: 411 - 420.
- Yang Huan-chun, Li Yong, Lü Wen-he, Du Ying-qiu, Shan Hong, Kong Bao-hua. 2015. Comparison of determination method for amylose content in potato tubers. *Chinese Potato Journal*, 146 (6): 37 - 41. (in Chinese)  
杨焕春, 李勇, 吕文河, 杜英秋, 单宏, 郭保华. 2015. 马铃薯块茎直链淀粉含量检测方法的比较. *中国马铃薯*, 146 (6): 37 - 41.
- Zeng Fan-kui, Zhao Xin, Zhou Tian-hong, Liu Gang. 2012. Dual-wavelength colorimetric method for measuring amylose and amylopectin contents of potato starch. *Modern Food Science and Technology*, 28 (1): 119 - 122. (in Chinese)  
曾凡逵, 赵鑫, 周添红, 刘刚. 2012. 双波长比色法测定马铃薯直链/支链淀粉含量. *现代食品科技*, 28 (1): 119 - 122.
- Zhang Jiao. 2018. Screening of potato breeding parents of stable food and establishment of shade tolerance evaluation system[M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)  
张娇. 2018. 主食化马铃薯育种亲本的筛选及耐荫性评价体系的建立[硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Zhao Y J, Li N, Li B, Li Z X, Xie G N, Zhang J. 2015. Reduced expression of starch branching enzyme IIa and IIb in maize endosperm by RNAi constructs greatly increases the amylose content in kernel with nearly normal morphology. *Planta*, 241 (2): 449 - 461.
- Zhu T, Jackson D S, Wehling R L, Geera B. 2008. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. *Cereal Chemistry*, 85: 51 - 58.