

甘露糖 (D-Mannose) 含量检测试剂盒说明书

(货号: G0583W48 微板法 48 样)

一、产品简介:

本试剂盒提供一种定量、快速、简单、灵敏的检测甘露糖含量的方法, 甘露糖经特异性酶作用后转化为葡萄糖, 葡萄糖在己糖激酶等酶复合物作用下, 使NADPH的量不断增加, 通过检测340nm下该物质的增加量, 进而计算得到甘露糖含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	粉剂×1支	-20℃保存	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加0.6mL蒸馏水备用。
试剂二	液体0.6mL×1支	4℃保存	
试剂三	液体10mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂×1支	-20℃保存	临用前甩几下或离心, 使粉剂落入底部, 再加0.6mL蒸馏水备用, 可分装后-20℃保存。
试剂五	液体μL×1支	-20℃保存	临用前甩几下或离心, 使微量液体落入底部, 再加0.6mL蒸馏水备用, 可分装后-20℃保存。
试剂六	液体μL×1支	-20℃保存	临用前甩几下或离心, 使微量液体落入底部, 再加0.6mL蒸馏水备用, 可分装后-20℃保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。 使用方法: 用前标准管(甘露糖)甩几下使粉剂落入底部, 再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 40μmol/mL, 再稀释 20 倍成 2μmol/mL 后备用; 按照加样表中测定管操作(样本更换成备用浓度标准品)。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、天平、可调式移液器、研钵、水浴锅、离心机、蒸馏水。

四、甘露糖含量检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取 0.1g 组织样本(水分充足的样本建议取 0.2g 左右)至 EP 管中, 加 1mL 的蒸馏水或生理盐水研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 常温离心 10min, 上清液待测。

【注】: 做实验前可以选取几个样本, 找出适合本次检测样本的稀释倍数 D, 果实样本含糖量较高, 可稀释 20-40 倍; 叶片样本可稀释 2-5 倍。

② 液体样品:

近似中性的澄清液体样本可直接检测; 若为酸性样本则需先用 NaOH(2M)调 PH 值约 7.4, 然后室温静置 30min, 取澄清液体直接检测。

【注】可选取几个样本, 进行不同倍数的稀释, 选取适合本次样本的稀释倍数 D。

③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水或生理盐水, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 室温离心 10min, 取上清, 上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），或于 25℃水浴锅中孵育 15min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	130	130
试剂四	10	10
试剂五	10	10
混匀，室温（25℃）反应20min于340nm处读取各管的A1值（若A值继续增加，可延长反应时间，直至2分钟内的吸光值保持不变即2分钟内吸光值变化不超过0.05）。		
试剂六	10	10
混匀，室温（25℃）反应30min于340nm处读取各管的A2值（若A值继续增加，需延长反应时间，直至2分钟内的吸光值保持不变即2分钟内吸光值变化不超过0.05）， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定- $(A2 - A1)$ 空白。		

- 【注】1.试剂一和二和三和四和五可按照比例10:10:130:10:10可预先混合（检测多少个样本预先混合多少样本的试剂量，现配现用），混合后直接加170 μL 混合液即可。检测反应20min后是否反应完全，在准备读值时可改用时间扫描：3min，间隔1min，依此判读反应是否完全。然后再读取各测定管的A值。
- 2.若A2值超过1，可以减少样本加样量V1（如减至5 μL ），则试剂三相应增加；或对样本用蒸馏水进行稀释，稀释倍数D和改变后的V1需代入计算公式计算。
- 3.若 ΔA 的差值在零附近即 ΔA 小于0.01，可增加样本加样量V1（如增至40 μL ），则试剂三相应减少，改变后的V1需代入计算公式计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\text{甘露糖含量}(\text{mg/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div (W \times V1 \div V) \times D = 0.572 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照体积计算：

$$\text{甘露糖含量}(\text{mg/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3] \div V1 \times D = 0.572 \times \Delta A \times D$$

3、按细胞数量计算：

$$\text{甘露糖含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 572 \times \Delta A \div 500 \times D$$

ϵ ---NADPH 的摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d---光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr---甘露糖分子量，180.16；

500---细胞数量，万；

W---样本鲜重，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。