

## 甘露糖-6-磷酸 (D-Mannose-6-phosphate, M6P) 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX062 微板法 96 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-6-磷酸(M6P)含量的方法,甘露糖-6-磷酸经磷酸甘露糖异构酶作用后转化为磷酸果糖,磷酸果糖在磷酸葡萄糖异构酶和磷酸葡萄糖脱氢酶等酶合物作用下,使NADP<sup>+</sup>转化成NADPH,通过检测NADPH在340nm下增加量进而计算得出甘露糖-6-磷酸(M6P)含量。

### 二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体100mL×1瓶	4℃保存	
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2.2mL蒸馏水备用。
试剂二	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	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1.1mL蒸馏水备用,可分装后-20℃保存。
试剂四	液体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1.1mL蒸馏水备用,可分装后-20℃保存。
试剂五	液体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1.1mL蒸馏水备用,可分装后-20℃保存。

### 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-6-磷酸(M6P)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),加1mL的提取液研磨,粗提液全部转移到EP管中,12000rpm,常温离心10min,上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取。

##### ② 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提取液,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 4℃离心10min,取上清,置冰上待测。

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

##### ③ 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。

#### 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	20	20
试剂二	130	130
试剂三	10	10
试剂四	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）。		
试剂五	10	10
混匀，室温（25℃）反应20min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）， $\Delta A=(A2-A1)$ 测定 $-(A2-A1)$ 空白。		

- 【注】1.试剂一和二和三和四可按照比例20:130:10:10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 $\mu$ L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 $\mu$ L），则试剂二相应增加；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 $\Delta A$ 的差值在零附近即 $\Delta A$ 小于0.01，可增加样本加样量V1（如增至40 $\mu$ L），则试剂二相应减少，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：

$$\begin{aligned} \text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 825.4 \times \Delta A \div W \times D \end{aligned}$$

### 2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.7 \times \Delta A \times D \end{aligned}$$

### 3、按照体积计算：

$$\text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 \times D = 825.4 \times \Delta A \times D$$

$\epsilon$ ---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-6-磷酸（M6P）分子量，260；

500---细胞数量，万；

W---样本鲜重，g；

D---稀释倍数，未稀释即为1。