

甘露糖 (D-Mannose) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-TDX053 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水备用, 可分装后 -20℃保存。
试剂五	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使微量液体落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水备用, 可分装后 -20℃保存。
试剂六	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使微量液体落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水备用, 可分装后 -20℃保存。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、甘露糖含量检测:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

取 0.1g 组织样本 (水分充足样本建议取 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、检测步骤：

- 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；在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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170μL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5μL），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40μL），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：

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

2、按照体积计算：

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

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。

