

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

(货号: ADS-W-TDX062-48 微板法 48 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-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⁺转化成NADPH,通过检测NADPH在340nm下增加量进而计算出甘露糖-6-磷酸(M6P)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
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使粉剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水备用,可分装后-20℃保存。
试剂四	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使微量液体落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 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 2mim 使微量液体落入管底(可手动甩一甩); 2. 再加 0.6mL 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-6-磷酸(M6P)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(10⁴):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。

【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。

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。
- ③ 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	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：

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

$$=825.4 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算：

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

$$=1.7 \times \Delta A \times D$$

3、按照体积计算：

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

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-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。