

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

(货号: ADS-F-TDX062 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

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⁺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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 1 瓶	-20°C保存	1. 开盖前注意使液体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20°C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 1.1mL 蒸馏水溶解,可分装后-20°C 保存。
试剂四	液体 1 支	-20°C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 1.1mL 蒸馏水混匀,可分装后-20°C 保存。
试剂五	液体 1 支	-20°C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 1.1mL 蒸馏水备用,可分装后-20°C 保存。

三、所需仪器和用品:

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)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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°C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。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min, 设置温度在 25°C, 设定波长到 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C), 或于 25°C 水浴锅中孵育 15min。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	60	
蒸馏水		60
试剂一	40	40
试剂二	560	560
试剂三	20	20
试剂四	20	20
混匀, 室温 (25°C) 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	20	20
混匀, 室温 (25°C) 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即 2 分钟内吸光值变化不超过 0.05。), $\Delta A = (A2 - A1) \text{测定} - (A2 - A1) \text{空白}$ 。		

【注】1. 试剂一和二和三和四可按照比例 40:560:20:20 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 640μL 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 1.5, 可以减少样本加样量 V1 (如减至 20μL), 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 120μL), 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:

$$\text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ = 495.2 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按细胞数量计算:

$$\text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ = 1 \times \Delta A \times D$$

3、按照体积计算:

$$\text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g} / \text{mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 \times D = 495.2 \times \Delta A \times D$$

4、按照蛋白浓度计算:

$$\text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g}/\text{mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (Cpr \times V1 \div V) \times D \\ = 495.2 \times \Delta A \div Cpr \times D$$

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

d---光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.06mL;

Mr---甘露糖-6-磷酸 (M6P) 分子量, 260;

V2---反应总体积, $7.2 \times 10^4 \text{ L}$;

W---样本鲜重, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---蛋白浓度 (mg/mL); 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。