

甘露糖 (D-Mannose) 含量检测试剂盒说明书

(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°C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°C保存	
试剂三	液体10mL×1瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂×1支	-20°C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°C保存。
试剂五	液体μL×1支	-20°C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°C保存。
试剂六	液体μL×1支	-20°C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°C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、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°C,设定波长到 340nm。

② 所有试剂解冻至室温(25°C),或于 25°C 水浴锅中孵育 15min;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°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)。		
试剂六	10	10
混匀, 室温 (25°C) 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), $\Delta A = (A2 - A1)_{\text{测定}} - (A2 - A1)_{\text{空白}}$ 。		

- 【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。