

甘露糖 (D-Mannose) 含量检测试剂盒说明书

(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℃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。
试剂二	液体1mL×1支	4℃保存	
试剂三	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂四	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。
试剂五	液体μL×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。
试剂六	液体μL×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、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℃，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。