甘露糖（D-Mannose）含量检测试剂盒说明书

（货号：G0583F 分光法 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℃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30mL×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。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	**仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常（不参与结果计算）。** 使用方法：用前标准管（甘露糖）甩几下使粉剂落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 40μmol/mL，再稀释 40 倍成 1μmol/mL 后备用；按照加样表中测定管操作（样本更换成备用浓度标准品）。

三、所需仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 的石英比色皿（光径 1cm）、天平、可调式移液器、研钵、水浴锅、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 紫外分光光度计预热 30min，设置温度在 25℃，设定波长到 340nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），或于 25℃水浴锅中孵育 15min。

③ 在 1mL 的石英比色皿（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	20	20
试剂二	20	20
试剂三	560	560
试剂四	20	20
试剂五	20	20
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	20	20
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），ΔA=(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20:20:560:20:20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120μL），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：

甘露糖含量(mg/g 鲜重)=$[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V2\times Mr\times 10^3]\div(W\times V1\div V)\times D=0.343\times\Delta A\div W\times D$

2、按照体积计算：

甘露糖含量(mg/mL)=$[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V2\times Mr\times 10^3]\div V1\times D=0.343\times\Delta A\times D$

3、按细胞数量计算：

甘露糖含量(μg/10^4 cell)=$[\Delta A\div(\varepsilon\times d)\times V2\times Mr\times 10^6]\div(500\times V1\div V)\times D=343\times\Delta A\div 500\times D$

ε---NADPH 的摩尔消光系数，6.3×10^3 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；

V2---反应总体积，7.2×10^{-4} 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。