

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

(货号: G0594F 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-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下增加量进而计算得出甘露糖-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℃保存	
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2.2mL蒸馏水备用。
试剂二	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	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蒸馏水溶解,可分装后-20℃保存。
试剂四	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蒸馏水混匀,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。
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(M6P)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20μmol/mL,再稀释20倍成1μmol/mL的M6P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、水浴锅、可调式移液器、研钵、离心机、蒸馏水。

四、甘露糖-6-磷酸(M6P)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),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。

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 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℃) 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℃) 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, 依此判断反应是否完全, 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:

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

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。