

D-Mannose Content Kit

甘露糖含量检测试剂盒说明书

货号: G0583W | 方法: 微板法 | 规格: 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°C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°C保存	
试剂三	液体15mL×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1.1mL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1.1mL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1.1mL蒸馏水备用,可分装后-20°C保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C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20倍成2μmol/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:

酶标仪、96孔板、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 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。
- ③ 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）， $\Delta A = (A2 - A1)$ 测定 - (A2 - A1) 空白。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。