

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

(货号: G0594W48 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-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°C保存	
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1.2mL蒸馏水备用。
试剂二	液体15mL×1瓶	4°C保存	
试剂三	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。
试剂四	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。
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(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:

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-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°C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。

【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。

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。
- 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	20	20
试剂二	130	130
试剂三	10	10
试剂四	10	10
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	10	10
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）， $\Delta A=(A2-A1)$ 测定-(A2-A1)空白。		

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\begin{aligned} \text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 825.4 \times \Delta A \div W \times D \end{aligned}$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 1.7 \times \Delta A \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算：

$$\text{甘露糖-6-磷酸(M6P)含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6] \div V1 \times D = 825.4 \times \Delta A \times D$$

ϵ ---NADPH 的摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d---光径，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-6-磷酸 (M6P) 分子量，260；

500---细胞数量，万；

W---样本鲜重，g；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。