

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

(货号: BP10006F 紫外法 48 样 有效期: 3 个月)

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	液体 1 瓶	-20℃保存	1. 开盖前注意使液体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 2.2mL 蒸馏水备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解,可分装后-20℃保存。
试剂四	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使微量液体落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水混匀,可分装后-20℃保存。
试剂五	液体 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使微量液体落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水备用,可分装后-20℃保存。

三、所需仪器和用品:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。。

四、指标测定:

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：

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

4、按照蛋白浓度计算：

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

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；

Cpr---蛋白浓度（mg/mL）；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。