

甘露糖（D-Mannose）含量检测试剂盒说明书

（货号：BP10324W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	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 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂×1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 再加 1mL 蒸馏水备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 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 蒸馏水备用，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。
试剂六	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、实验器材：

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）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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、检测步骤：

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；在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (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℃）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℃）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】1.试剂一和二和三和四和五可按照比例10:10:130:10:10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170μL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，可以减少样本加样量V1（如减至5μL），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40μL），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)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3$]÷(W×V1÷V)×D=0.572×ΔA÷W×D

2、按照体积计算：

甘露糖含量(mg/mL)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3$]÷V1×D=0.572×ΔA×D

3、按细胞数量计算：

甘露糖含量(μg/10⁴ cell)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6$]÷(500×V1÷V)×D=572×ΔA÷500×D

4、按照蛋白浓度计算：

甘露糖含量(mg/mg prot)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^3$]÷(Cpr×V1÷V)×D=0.572×ΔA÷Cpr×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;
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。