

无机磷测试盒说明书

(货号: C006-1-1 磷钼酸法 100管/96样)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

样品中的无机磷与钼酸作用生成磷钼酸, 后者被还原成钼蓝, 在 660nm 处有最大吸收峰, 通过比色可以计算出无机磷的含量。

二、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 6 个月)

试剂一: 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×2 瓶, 4℃ 保存; 用时每瓶加去离子水 20mL 充分溶解, 配好后 4℃ 避光可保存 2~3 周。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; 用时每瓶加去离子水 50mL 充分溶解, 配好后 4℃ 可保存 2 个月。

显色剂配制: 按试剂一:试剂二溶液:试剂三溶液:去离子水=1:1:1:2 的比例配制, 配好的工作液应为浅黄色(若颜色变绿或黑则显色剂失效), 现配现用。

试剂四: 10mmol/L 磷标准液, 1mL×1 支, 4℃ 保存。用时取部分用去离子水 20 倍稀释后配成 **0.5mmol/L 磷标准应用液** 待用。

沉淀剂: 50mL×1 瓶, 4℃ 保存。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪 (660nm) 及 96 孔板), 涡旋混匀器, 37℃ 水浴锅, 离心机, 去离子水。

四、操作过程:

1、样本准备:

- ① **血清(浆)等液体样本:** 直接使用。
- ② **动物组织:** 称重 (约 0.05-0.1g), 按重量 (g) 体积 (mL) 比为 1:10 (含量低时可按 1:5 制备) 的比例加入去离子水, 4℃ 研磨匀浆, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清待测 (上清可测定其蛋白浓度);
- ③ **细菌/细胞样本:** 收集细菌或细胞到离心管中 (注意去除培养液), 每 500 万细菌或细胞可加入 0.5mL 去离子水, 超声波碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 重复 5-10 次), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清待测 (上清可测定其蛋白浓度);
- ④ **植物组织样本:** 方法一是先将植物组织用去离子水擦洗干净, 再用吸水纸吸干, 后剪碎放入研钵中, 液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的去离子水, 涡旋震荡 (或研磨仪研磨) 1 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测; **方法二**是在洗净并擦干水分后, 直接称重, 按重量(g):体积(mL)=1:4 的比例, 加入 4 倍体积的去离子水, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测。(注: 一般水分含量较高的植物用方法二来处理且样本与试剂的比例可视具体情况调整, 相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

2、样本前处理:

取以上准备好的样本或上清 0.1mL 加入 0.4mL 沉淀剂 (低蛋白植物匀浆可按 **0.1 mL 样本+0.4 mL 去离子水混合**), 充分混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清按下表检测。(某些磷含量较高的样本 (如骨、鳞片等) 在进行上述处理后, 可能还需将上清再做一定的稀释, 方可进行操作, 具体稀释倍数以预实验测定管吸光值 ≤ 0.5 为宜, 稀释倍数代入计算公式计算)

3、操作表:

	测定管	标准管	空白管
处理后的上清 (mL)	0.2		
0.5mmol/L 磷标准应用液 (mL)		0.2	
去离子水 (mL)			0.2
显色剂 (mL)	2	2	2

混匀, 37℃ 水浴 30 分钟, 冷却至室温, 波长 660nm, 光径 1cm, 去离子水调零, 测定各管吸光度值 A (或是每管吸取 200μL 液体, 加到 96 孔板中, 酶标仪 660nm 处读数, 计算不变)

五、计算公式:

1、血清(浆)等液体样本计算:

$$\text{磷含量 (mmol/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

2、动物组织或细胞按蛋白浓度计算:

$$\text{无机磷含量 (mmol/g 蛋白)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div C_{\text{pr}}$$

3、动物或植物组织按鲜重计算:

$$\text{无机磷含量 (mmol/g 鲜重)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

4、细胞样本按细胞数计算:

$$\text{无机磷含量 (mmol/10}^6\text{ 细胞)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

C_{标准}: 标准品浓度, 0.5mmol/L;

N: 样本前处理时的稀释倍数, 5 或 2 (植物);

C_{pr}: 匀浆液蛋白浓度, g/L;

W: 样本鲜重, g;

V_{样总}: 样本匀浆时加入的去离子水的总体积, L;

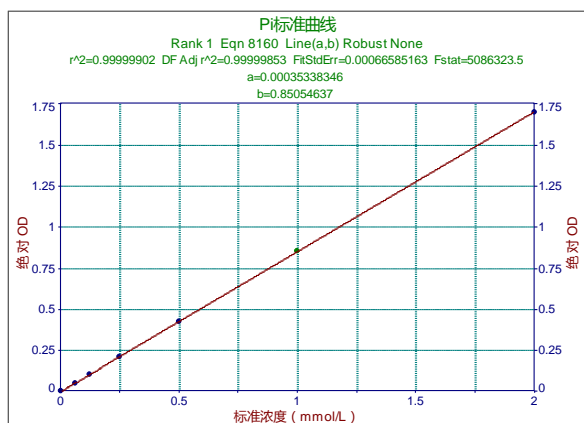
细胞总数: 细胞匀浆前的中数量, 10⁶ 个。

七、相关技术参数:

	计数参数	指标
1	检出限	0.02mmol/L
2	线性范围	0.02~2 mmol/L
3	试剂盒批内 CV	2.3%
4	试剂盒批间 CV	3.1%
5	呈色稳定性	1h
6	回收率	101%

附录：标准曲线制作：（选做）

取 10mmol/L 磷标准贮备液用去离子水稀释成不同浓度（0、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2mmol/L），按照操作表进行标准曲线制作：



（标准曲线可以不做，直接按前面的操作表操作，代入计算公式计算即可，不影响结果；若是制作了标准曲线，则可将样本测定管吸光值代入标准曲线计算得到的值替换计算公式中的

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

项，再继续运算，即可得样本最终结果)