

组织无机磷含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

无机磷主要指磷酸根，参与生物体内多种代谢，包括能量代谢、核酸代谢、蛋白质磷酸化和脱磷酸化等等，此外促进碳水化合物的合成、转化和转运。

测定原理：

钼蓝与磷酸根生成660nm有特征吸收峰的物质，通过测定660nm光吸收，即可计算无机磷含量。

自备仪器和用品：

离心机、水浴锅、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂二：液体5mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4°C避光保存。临用前配制，加入10 mL蒸馏水，充分溶解后加入试剂二（全部），混匀。

标准品：液体×1支。

无机磷提取：

按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一）进行冰浴匀浆。10000rpm，4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

测定：

1. 分光光度计/酶标仪预热30 min，调节波长到660 nm，蒸馏水调零。
2. 打开水浴锅，调节温度到40°C。
3. **空白管**：取0.5mL EP管，依次加入100μL蒸馏水，100μL试剂三，混匀后置于40°C水浴保温10min，室温冷却10 min后于660 nm测定吸光度，记为A空白管。
4. **标准管**：取0.5mL EP管，依次加入10μL标准液，90μL蒸馏水，100μL试剂三，混匀后置于40°C水浴保温10min，室温冷却10 min后于660 nm测定吸光度，记为A标准管。
5. **测定管**：取0.5mL EP管，依次加入10μL上清液，90μL蒸馏水，100μL试剂三，混匀后置于40°C水浴保温10min，室温冷却10 min后于660 nm测定吸光度，记为A测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

组织无机磷含量计算：

1. 按照蛋白含量计算

$$\begin{aligned} \text{无机磷含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= [\text{C标准液} \times (\text{A测定管} - \text{A空白管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管})] \times \text{V总} \div \text{Cpr} \\ &= 1 \times (\text{A测定管} - \text{A空白管}) \div (\text{A标准管} - \text{A空白管}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

无机磷含量($\mu\text{mol/g}$ 鲜重) = $[C_{\text{标准液}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})] \times V_{\text{总}} \div W$

= $1 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$

C标准液: 1mmol/L; V总: 上清液总体积, 1mL=0.001 L; W: 样品质量, g。

注意事项:

1. 试剂三需临用前配制, 并且当天使用完毕。
2. 40min内完成比色。
3. 最低检出限为 $10\mu\text{mol/L}$ 。

www.affandi-e.com