

组织总磷含量检测试剂盒说明书（微量法）

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

规格：100 T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体22 mL×1瓶	2-8℃保存
试剂二	液体7mL×1瓶	2-8℃保存
试剂三A	粉剂×1瓶	2-8℃保存
试剂三B	粉剂×1瓶	2-8℃保存
标准品	液体1mL×1支	2-8℃保存

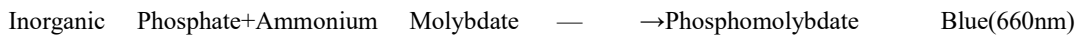
溶液的配制：

- 1、试剂一：强腐蚀性，强氧化性；易挥发，不使用时请及时盖紧盖子；
- 2、试剂三A：临用前加入5mL蒸馏水溶解，用不完的试剂2-8℃保存4周；
- 3、试剂三B：临用前加入5mL蒸馏水溶解，用不完的试剂2-8℃保存4周；
- 4、试剂三：临用前按试剂三A：试剂三B：试剂二=1:1:1的体积比例配制，配好的试剂三应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，**试剂三根据样本量现用现配，限当天使用；**
- 5、标准品：10mmol/L 无机磷标准液。

产品说明：

磷的存在形态包括无机磷与有机磷。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。通过测定总磷与无机磷含量即可了解作物对磷的利用率，进而为合理施肥提供依据。

总磷经消化后，转化成无机磷。钼蓝法是测定无机磷含量的经典方法，一定条件下，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，进而可计算出组织中总磷含量。



技术指标：

最低检出限：0.0338 mmol/L

线性范围：0.625-8 mmol/L

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、蒸馏水和浓硫酸(>95%,AR)。

操作步骤：

一、有机磷消化(可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献)

称取约0.1g 组织于带盖试管中，加浓硫酸1mL，盖紧(缠封口膜，防止爆盖)后沸水浴10min 左右，待溶液呈黑色或棕色时取出。稍冷后，加入200 μL 试剂一，充分混匀，盖紧后继续沸水浴，直到溶液呈透明状，取出室温冷却后，加蒸馏水3.8 mL，充分混匀；10000rpm，室温离心10min，取上清液，待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30 min 以上，调节波长到660 nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、打开水浴锅，调节温度到40℃。
- 3、1 mmol/L标准溶液的配制：取100 μL 10 mmol/L磷标准液和900 μL 蒸馏水混合配制成1mmol/L 的标准溶液。
- 4、样本测定：

试剂名称(μL)	空白管	标准管	测定管
标准液	-	10	
上清液	-	-	10
蒸馏水	100	90	90
试剂三	100	100	100

涡旋混匀，置于40℃水浴锅中准确保温10min, 室温冷却10 min, 于660 nm测定吸光度，分别记为A空白管、A标准管、A测定管。空白管和标准管只需测1-2次。

三、组织总磷含量计算

$$\text{总磷含量}(\text{mmol/g 质量}) = [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \times V \text{ 总} \div W$$
$$= 0.005 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$$

C 标准液：1 mmol/L; V 总：上清液总体积，5mL=0.005 L; W: 样本质量，g。

注意事项：

- 1、如果样本测定吸光值大于1.5，需用蒸馏水做相应稀释后进行测定。如果样本测定吸光值较低或接近空白值，建议增大样本量后重新进行测定。注意同步修改计算公式。

实验实例：

- 1、取0.1g 小鼠肾脏按照提取步骤操作，离心取上清之后按照测定步骤操作，使用96孔板测得计算A 测定管 =0.191, A 空白管=0.051, A 标准管=0.282, 按样本质量计算总磷含量得：

$$\text{总磷含量}(\text{mmol/g 质量}) = 0.005 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W = 0.030 \text{ mmol/g 质量}。$$

- 2、取0.1g 小鼠脾按照提取步骤操作，离心取上清之后按照测定步骤操作，使用96孔板测得计算 A 测定管 =0.197, A 空白管=0.051, A 标准管=0.282, 按样本质量计算总磷含量得：

$$\text{总磷含量}(\text{mmol/g 质量}) = 0.005 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W = 0.032 \text{ mmol/g 质量}。$$