

组织无机磷含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

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 光吸收可计算无机磷含量。

自备仪器和用品：

可见分光光度计、离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配置：

试剂一：液体×1 瓶，4℃保存。

试剂二：液体×1 瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。临用前配制，加入 20 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，4℃保存。

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℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定：

1. 分光光度计预热 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℃。
3. 空白管：取 EP 管，依次加入 500μL 蒸馏水，500μL 试剂三，混匀后置于 40℃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 EP 管，依次加入 50μL 标准液，450μL 蒸馏水，500μL 试剂三，混匀后置于 40℃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 EP 管，依次加入 50μL 上清液，450μL 蒸馏水，500μL 试剂三，混匀后置于 40℃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公式：

(1) 按照蛋白含量计算

无机磷含量(μmol/mg prot)=[C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×V 总÷Cpr

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

(2) 按照样本质量计算

$$\text{无机磷含量}(\mu\text{mol/g}) = [C_{\text{标准液}} \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})] \times V_{\text{总}} \div W \\ = 1 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$$

C 标准液: 1mmol/L; V 总: 上清液总体积, 1mL=0.001 L; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 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 $\mu\text{mol/L}$ 。