

组织总磷含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-D043 微板法 96 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

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。

测定原理:

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。

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、蒸馏水和浓硫酸。

试剂组成和配置:

试剂一: 液体 20ml×1 瓶, 4℃ 保存 (强腐蚀性, 强氧化性)。

试剂二: 液体 7ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 粉剂×1 瓶, 4℃ 避光保存。**临用前配制, 加入 7.5mL 蒸馏水, 溶解后再加入 5mL 试剂二, 混匀。**

标准品: 液体 1ml×1 支, 1mmol/L 无机磷标准液, 4℃ 保存。

有机磷消化:

取带盖试管, 加入精确称取的约 0.1g 组织, 加浓硫酸 1 mL, 盖紧 (防止水分散失) 后沸水浴 10min 左右, 待溶液呈黑色或棕色时取出。稍冷后, 加试剂一 200μL, 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 8.8 mL, 充分混匀; 室温, 10000rpm, 离心 10min, 取上清液, 待测。

测定:

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 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 0.5mL EP 管, 依次加入 100μL 蒸馏水, 100μL 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 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℃ 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℃ 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。

组织总磷含量计算:

(1) 按照蛋白含量计算

无机磷含量(μmol/mg prot)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div Cpr$$

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

(2) 按照样本质量计算

无机磷含量(μmol/g 鲜重)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 总} \div W$$

$=10 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div W$

C 标准液：1mmol/L；V 总：上清液总体积，10mL；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，限当天使用。
- 2、测定前先用 1~2 个样品做预实验，如吸光值很高，需用蒸馏水做相应稀释。
- 3、40min 内完成比色。