

组织总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：

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：

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、蒸馏水和浓硫酸。

试剂组成和配置：

试剂一：液体×1 瓶，4℃保存（强腐蚀性，强氧化性）。

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 15 mL 蒸馏水，溶解后再加入 10 mL 试剂二，混匀。

标准品：液体×1 支，-20℃保存。

有机磷消化：

取带盖试管，进入精确称取 50℃烘干至恒重的约 0.1 g 组织，加浓硫酸 1.0 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，8000g，离心 10min，取上清液待测。

测定操作：

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。

组织总磷含量计算公式：

(1) 按照蛋白含量计算

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

(2) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{总磷含量}(\text{mmol/g 干重}) &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 总} \div \text{W} \\ &= 1 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W} \end{aligned}$$

C 标准液：1 mmol/L；V 总：上清液总体积，10 mL=0.01 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 μmol/L。