（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

产品货号：E-BC-K832-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(630-650 nm)

Elabscience®磷酸盐比色法测试盒(孔雀石绿法)

Phosphate Colorimetric Assay Kit

(Malachite Green Method)

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、组织以及细胞样本中磷酸盐的含量。

检测原理

磷是一种重要的矿物质，是所有动物的必需营养元素之一，对维持磷酸盐稳态至关重要。

孔雀石绿法是一种分析磷酸盐灵敏度很高的方法。原理是磷酸根与钼酸根在酸性条件下形成的化合物会与孔雀石绿形成显色物质，颜色的深浅与磷酸盐的含量成正比，通过测定 636 nm 处的吸光度变化来测定样本中磷酸盐含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (48 T)	规格 2 (Size 2) (96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	6 mL×1 瓶	12 mL×1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	2 mL×1 瓶	4 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	30 mL×1 瓶	60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	10 mmol/L 标准品 (10 mmol/L Standard)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(630 - 650 nm，最佳检测波长 636 nm)，恒温箱(37 ℃)、匀浆机、低温离心机

试剂：生理盐水（0.9% NaCl）

试剂准备

① 检测前，所有的试剂平衡至室温；

② 显色工作液的配制：

将试剂一：试剂二：双蒸水按照 3: 1: 4 体积比进行配制，配制好的显色工作液在 37 ℃ 孵育 1 h，按需配制，避光保存，当天使用完毕；

③ 0.2 mmol/L 标准品的配制：

将试剂四与双蒸水按 1: 49 体积比进行稀释，按需配制，2-8 ℃ 保存 7 天。

④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	**0**	**0.01**	**0.02**	**0.05**	**0.10**	**0.12**	**0.15**	**0.20**
0.2 mmol/L	0	10	20	50	100	120	150	200
双蒸水(μL)	200	190	180	150	100	80	50	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：组织处理的匀浆介质为生理盐水(0.9% NaCl)，匀浆后 4℃，12000 ×g,离心 10 min 取上清,将样本上清与试剂三按照 1: 1 比例混匀,4℃，12000 ×g，离心 10 min 取上清待测。

细胞样本:将收集好的细胞(1×10^6)与生理盐水(0.9% NaCl) (mL)按照5: 1比例进行匀浆，4℃，12000 ×g，离心10 min取上清，将样本上清与试剂三按照1: 1比例混匀，4℃，12000 ×g，离心10 min取上清待测。

血清(浆)样本:将血清（浆）与试剂三按照1: 1比例混匀, 4℃, 12000 ×g，离心10 min取上清待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.001-0.20 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	15-25	10%大鼠心组织	15-25
10%大鼠脾组织	15-25	10%大鼠脑组织	15-25
10%大鼠肾组织	15-25	10%小鼠心组织	15-25
10%小鼠肺组织	15-25	10%小鼠卵巢组织	50-70
大鼠血清	8-12	大鼠血浆	8-12
人血浆	8-12	10^6 HL-40 细胞	2-5

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

① 所用实验器具需多次冲洗(10 次左右)，避免外部磷污染。

② 测定绝对 OD 值大于 1.2 时，需要增加稀释倍数重新检测。

③ 试剂一先在 37℃ 条件下孵育至无胶状物质存在。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品加入到相应酶标孔中；

测定孔：取 20 μL 待测样本加入到相应酶标孔中；

② 向步骤①中各酶标孔加入 200 μL 显色工作液；

③ 振板 5 s，37 ℃避光孵育 20 min，酶标仪 636 nm 处测定各孔 OD 值；

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度标准品(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
显色工作液(μL)	200	200
振板 5 s，37 ℃避光孵育 20 min，酶标仪 636 nm 处测定各孔 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

组织样本中磷酸盐含量

$$磷酸盐(mmol/kg\ wet\ weight) = \frac{\Delta A - b}{a} \div \frac{m}{V} \times f \times 2^*$$

血清/血浆样本中磷酸盐含量计算：

$$磷酸盐(mmol/L) = \frac{\Delta A - b}{a} \times f \times 2^*$$

细胞样本中磷酸盐含量计算：

$$磷酸盐(mmol/10^6) = \frac{\Delta A - b}{a} \div \frac{n}{V} \times f \times 2^*$$

注解:

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA：样本测定 OD 值-空白 OD 值

m：组织样本的质量，g

V：匀浆液体积，mL

n：细胞匀浆个数，10^6

2*：样本处理时稀释的倍数

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录 1 关键数据

1. 技术参数

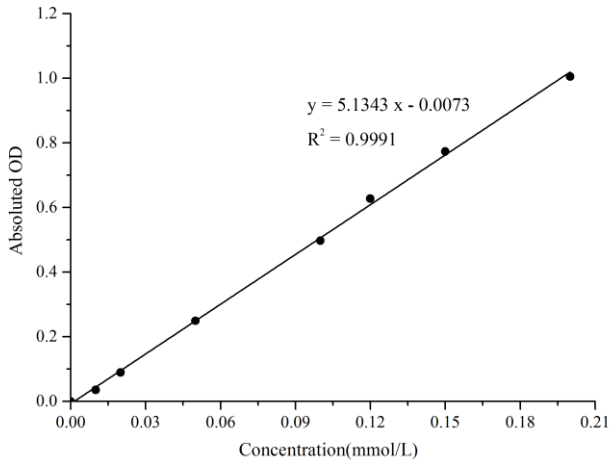
检测范围	0.001-0.20 mmol/L	**平均批间差**	8.0 %
灵敏度	0.001 mmol/L	**平均批内差**	4.0 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，各孔OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0.00**	**0.01**	**0.02**	**0.05**	**0.10**	**0.12**	**0.15**	**0.20**
OD 值	0.141	0.179	0.234	0.399	0.629	0.772	0.911	1.143
	0.142	0.175	0.228	0.383	0.649	0.766	0.919	1.151
平均 OD 值	0.142	0.177	0.231	0.391	0.639	0.769	0.915	1.147
绝对 OD 值	0.000	0.036	0.090	0.250	0.498	0.628	0.774	1.006

② 绘制标曲(如下图)：



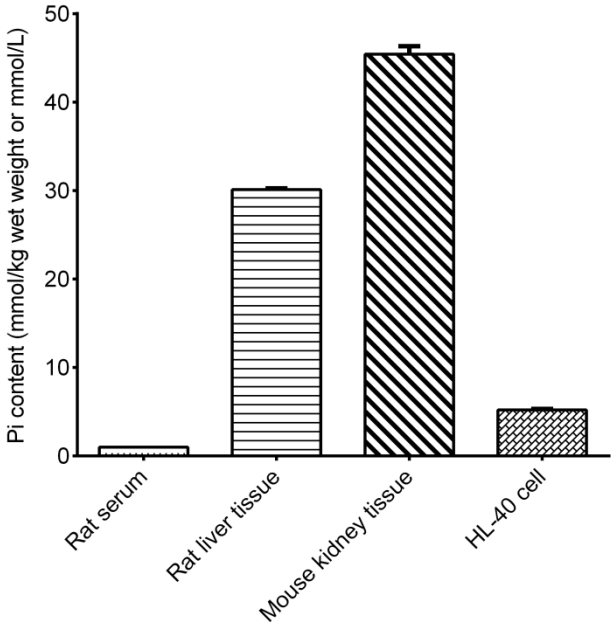
附录 2 实例分析

例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释 20 倍的 10%大鼠肝组织样本，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 5.1343 x - 0.0073，样本空白孔 OD 值为 0.142，样本测定孔 OD 值为 0.564，计算结果为：

$$\text{磷酸盐(mmol/kg wet weight)} = \frac{(0.564 - 0.142) + 0.0073}{5.1343} \div \frac{0.1}{0.9} \times 20 \times 2 = 30.06 \text{ mmol/kg wet weight}$$

按照说明书操作，测定大鼠血清（稀释 10 倍，加样量 20 μL），大鼠肝组织(10%组织匀浆，稀释 20 倍，加样量 20 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆，稀释 20 倍，加样量 20 μL)、HL-40 细胞(稀释 3 倍，加样量 20 μL)中磷酸盐含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
测试结果偏低	样本稀释倍数较大	减小样本稀释倍数

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。