

(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-K245-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(620-690 nm)

Elabscience®磷(Pi)比色法测试盒(磷钼酸法)
Phosphorus (Pi) Colorimetric Assay Kit (Phospho
Molybdate 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、组织样本中的磷的含量。

检测原理

无机磷与钼酸作用形成磷钼酸，在还原剂的作用下，磷钼酸被还原成钼蓝，在 660 nm 处有最大吸收峰，在一定范围内吸光度值与浓度成正比。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

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)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 C (Chromogenic Agent C)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	20 mL×1 瓶	40 mL×1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	10 mmol/L 磷标准品 (10 mmol/L Phosphorus Standard)	1 mL×1 支	1 mL×1 支	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	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(620 nm-690 nm，最佳检测波长为 660 nm)

试剂：双蒸水、生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

取一瓶试剂二，向其中加入 10 mL 双蒸水，充分溶解，2-8℃避光保存 5 天。

③ 试剂三工作液的配制：

取一瓶试剂三，向其中加入 10 mL 双蒸水，充分溶解，2-8℃保存 2 个月。

④ 显色剂工作液：

将双蒸水：试剂一：试剂二工作液：试剂三工作液按 2：1：1：1 的体积比混匀，现用现配，2-8℃避光保存 24 h。

⑤ 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	0.1	0.2	0.5	0.8	1.0	1.5	2.0
10 mmol/L 标准品(mL)	0	0.01	0.02	0.05	0.08	0.1	0.15	0.2
生理盐水(mL)	1	0.99	0.98	0.95	0.92	0.9	0.85	0.8

样本准备

① 样本处理

血清血浆等液体样本：直接进行测定。

组织样本：取 0.020-1.0 g 新鲜组织块，用 2-8℃的生理盐水(0.9%NaCl)漂洗，去除血液，滤纸吸干，称重，放入匀浆容器中，按照重量(g): 体积(mL)= 1: 9 的比例加入生理盐水(0.9%NaCl)，进行匀浆，4℃，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

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：0.004-2.0 mmol/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%大鼠肝匀浆	不稀释
小鼠血清	不稀释	10%小鼠肺匀浆	不稀释
大鼠血浆	不稀释	10%小鼠脑匀浆	不稀释
人尿液	2-3	10%大鼠肌肉匀浆	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

使用时注意防止磷污染，显色剂现用现配。

操作步骤

- ① **上清液的制备:**取 0.1 mL 血清(浆)或者 10%组织匀浆于 1.5 mL EP 管中，加入 0.4 mL 试剂四，充分混匀，1100 × g，离心 10 min，取上清待测。
- ② **标准孔:**取 35 μL 不同浓度的标准液，加入到对应的标准孔中。
样本孔:取 35 μL 样本上清，加入到对应的样本孔中。
- ③ 向步骤①标准孔、样本孔加入 200 μL 显色剂工作液。
- ④ 酶标仪上振板 10 s，37℃孵育 30 min，660 nm 处，测各孔的 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	35	--
待测样本(μL)	--	35
显色剂工作液(μL)	200	200
酶标仪上振板 10 s，37℃孵育 30 min，660 nm 处，测各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)中磷浓度计算公式:

$$\text{Pi (mmol/L)} = (\Delta A_{660} - b) \div a \times 5 \times f$$

组织中磷浓度计算公式:

$$\text{Pi (mmol/gprot)} = (\Delta A_{660} - b) \div a \times 5 \times f \div C_{\text{pr}}$$

注解:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔA_{660} : 样本 OD 值-空白 OD 值(标准浓度为 0 时的 OD 值)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 样本蛋白浓度 (gprot/L)

5: 上清液制备过程中样本被稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

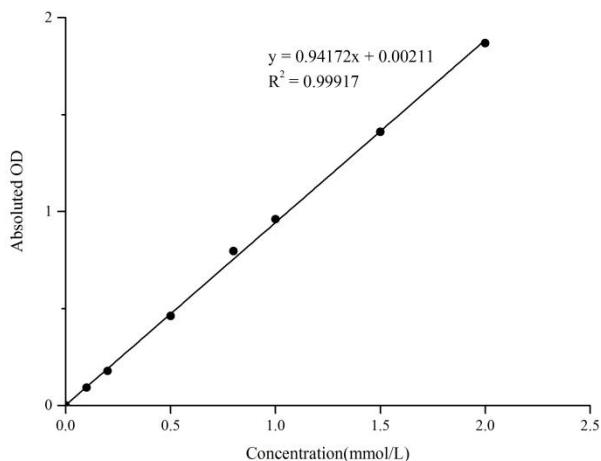
检测范围	0.004-2.0 mmol/L	平均批间差	3.0 %
灵敏度	0.004 mmol/L	平均批内差	2.1 %
平均回收率	101 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量35 μ L，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.2	0.5	0.8	1	1.5	2
OD 值	0.053	0.144	0.231	0.517	0.870	1.008	1.473	1.910
	0.049	0.142	0.227	0.508	0.824	1.016	1.451	1.929
平均 OD 值	0.051	0.143	0.229	0.512	0.847	1.012	1.462	1.919
绝对 OD 值	0.000	0.092	0.178	0.461	0.796	0.961	1.411	1.868

②制标准曲线，如下图所示：



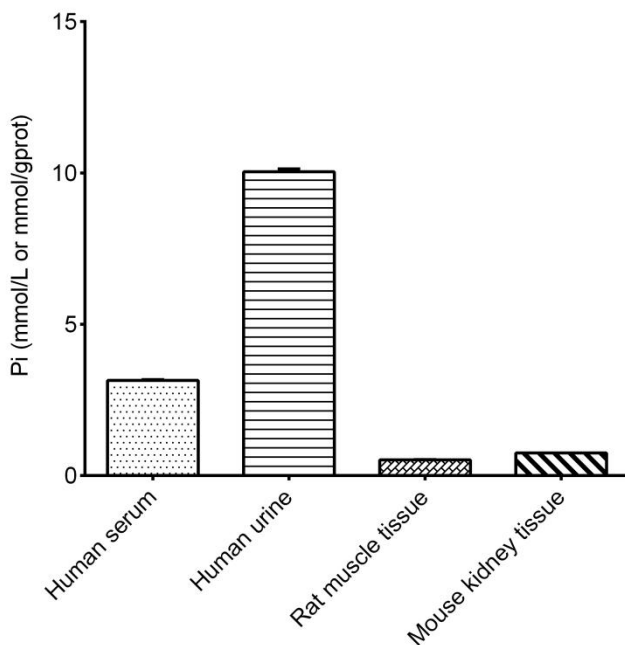
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取100 μL 人血清。按操作表操作, 标准曲线: $y = 0.9268x + 0.0059$, 测定孔平均OD值为0.652, 空白孔平均OD值为0.062, 计算结果为:

$$\text{Pi (mmol/L)} = (0.652 - 0.062 - 0.0059) \div 0.9268 \times 5 = 3.15 \text{ mmol/L}$$

按照操作过程, 测定人血清(加样量35 μL)、人尿液(稀释2倍, 加样量35 μL)、大鼠肌肉(10%组织匀浆, 蛋白含量3.98 gprot/L, 加样量35 μL)和小鼠肾(10%组织匀浆, 蛋白含量5.00 gprot/L加样量35 μL)中总磷含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本和标准品显色很低	孵育时间太短	保证充足的孵育时间
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数，重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果> 2.0 mmol/L	样本浓度太高	选择合适稀释倍数，重新检测
读数数值低	用不恰当波长检测	选择正确的检测波长

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。

附录4 客户发表文献

1. Wei S , Amevor F K , Du X ,et al.Quercetin mitigates iron-induced cell death in chicken granulosa cell[J].Journal of Animal Science & Biotechnology, 2024, 15(1).DOI:10.1186/s40104-024-01118-0.
2. Yang Y , Tan L , He S ,et al.Sub-MIC vancomycin enhances the antibiotic tolerance of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus through downregulation of protein succinylation[J].Microbiological Research, 2024, 282(000):8.DOI:10.1016/j.micres.2024.127635.
3. Li T .Enhancement of Calcium Chelating Activity in Peptides from Sea Cucumber Ovum through Phosphorylation Modification[J].Foods, 2024, 13.DOI:10.3390/foods13121943.
4. Wang J Y , Hsu H Y , Liu S T ,et al.Ammonia exposure impairs bone mineralization in zebrafish (Danio rerio) larvae[J].Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2025, 287.DOI:10.1016/j.cbpc.2024.110040.
5. Sun Z , Feng X , Shi Y ,et al.Sodium alginate improves phytase stability and enhances soil phosphorous utilization[J].Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2024, 61.DOI:10.1016/j.bcab.2024.103372.

